

HUELLA DACTILAR DE TRIGO ARGENTINO: EVALUACIÓN DE LA TRAZABILIDAD QUÍMICA Y LAS CARACTERÍSTICAS ANTIOXIDANTES DE TRIGO, HARINA Y DERIVADOS.



Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias
Químicas

Lic. Natalia Soledad Podio



Departamento de Química Orgánica

Facultad de Ciencias Químicas

ICYTAC: Instituto de Ciencia y Tecnología de
Alimentos Córdoba

Universidad Nacional de Córdoba

2015

Director de tesis:

Dr. Daniel A. Wunderlin

Comisión de tesis:

Dra. María V. Baroni

Dra. Patricia I. Ortiz

Dra. Silvia C. Kivatinitz

Evaluadora externa:

Dra. Mónica A. Nazareno

***A Diego,
a mi madre,
a mi abuela...***

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todas las instituciones que permitieron, financiaron y/o colaboraron con esta tesis: Facultad de Ciencias Químicas-UNC (Depto. de Química Orgánica, Depto. de Bioquímica Clínica y CEQUIMAP), CONICET (ICYTAC y CIBICI), proyecto TRACE, FONCYT, ISIDSA-SECYT-UNC, CEPROCOR, INGEIS, Facultad de Ciencias Agropecuarias-UNC y Universidad Complutense de Madrid (Depto. de Nutrición y Bromatología II-Facultad de Farmacia).

Gracias a mi comisión de tesis, por los aportes y el seguimiento durante estos últimos cinco años, y a la evaluadora externa por recibir y evaluar esta tesis.

También quiero agradecer a mi director, primero por darme la posibilidad de trabajar en el TRACE, donde comenzaron mis pasos como licenciada y el cual me permitió aprender a trabajar rigurosamente, bajo estrictas condiciones de limpieza y con poco margen de error. Después por darme la posibilidad de colaborar y trabajar en distintos grupos de los cuales pude llevarme muchas cosas buenas. Por la libertad de trabajo y por ayudar a que hoy concluya esta tesis.

A mi co-directora de beca (Vero), porque si ella no me hubiese insistido y alentado con el doctorado allá por el año 2009 como lo hizo, hoy no estaría escribiendo estas líneas. Gracias por guiar mis primeros pasos en la investigación, por defenderme cada vez que hizo falta y por estar presente durante estos últimos cinco años.

Gracias también a los chicos del instituto: Magda, Romi, Julili, Joa y Sil por los consejos, el aguante, las risas y sobre todo por los mates compartidos, sin ustedes el instituto no sería lo mismo. Tampoco sería lo mismo sin Marilyn, gracias por estar presente cada vez que lo necesité, por estar siempre predispuesta a ayudar, por introducirme en el mundo de las levaduras, y por intentar contagiarme tu entusiasmo por ellas, aunque lamentablemente no pudimos lograrlo. También por hacer de la digestión *in vitro* algo muy divertido, sobre todo cuando de la primera etapa se trataba.

No puedo dejar de agradecer a los chicos de Bromato: Ro, Lucas, Vale, Chani, Ramón y Santi (aunque se haya mudado al piso superior), por la buena disposición, y por aguantar ese olor tan especial durante tres largos años. También quiero agradecer muy especialmente a Lid, por estar siempre presente, en las buenas y en las malas, por ayudarme con los *boosted*, por malcriarnos con tantas cosas ricas y por ser una muy buena amiga.

Gracias a Mari, Ceci, Geral, Martín y Ricardo, los chicos del CEQUI, por estar siempre presentes, por ayudarme cada vez que lo necesité, por ser tan buenos y predispuestos conmigo.

Gracias también a los chicos de agronomía, especialmente a Gaby, Belén, Estefi, Anita y Pablo, por abrirme las puertas de agronomía, ayudarme con las muestras de trigo y la elaboración de fideos.

A Marce y Raúl, del CEPROCOR, y a Ma. Luisa, Cortes, Rebecca y Esther de la UCM, gracias por su ayuda durante mis visitas y estancia.

También quiero agradecer a Jorge y Ana, mi futuro grupo de trabajo, por las enseñanzas y la ayuda brindada estos últimos meses.

A Papel Entrada por la buena onda, las impresiones, y por los horarios extraños y permisos que Diego tuvo que pedir a raíz de esta tesis.

A todo el departamento de orgánica, por hacerme sentir en casa, pero sobre todo a las chicas del laboratorio 001: Luri, Ivi, Roxy, Luz y Lizi, por incluirme en su grupo desde el primer día, por estar siempre presentes, en las buenas y en las malas, laboral y personalmente, gracias por compartir cada almuerzo, por ser tan buenas amigas y sobre todo por hacer que cada día sea especial. Gracias también a Nati, por llegar en un momento único, por ayudarnos con todo, por la buena onda, la buena predisposición y sobre todo los buenos consejos.

Gracias a todos los amigos que estuvieron presentes antes y durante estos cinco años. Muy especialmente quiero agradecer a Juani, Guada, Agu y Anucha, por estar en las buenas y en las malas, por ayudarnos a superar cada obstáculo, por levantarnos cuando estamos a punto de caer, por hacernos reír siempre, por festejar lo no festejable y por ser tan especiales, sin ustedes las cosas no hubiesen sido lo mismo.

A toda mi familia y la familia de Diego, por estar en cada momento de nuestras vidas, por perdonar todo el tiempo robado y las ausencias. En especial a mi madre y mi abuela, por estar siempre presentes y atentas a todo, por ayudarnos en tiempos difíciles y por brindarnos su amor incondicional, y a mí hermano, por el acilo y la compañía brindada.

Finalmente quiero agradecer a dos personas muy especiales que hicieron posible esta tesis, sin las cuales hoy no estaría en esta instancia.

Gracias Euge, por ser y entender mejor que nadie lo que fue esta tesis, por compartir escritorio, mates, charlas, escritura y todo lo que no se puede decir. Gracias por haber estado en los tiempos más difíciles, por alentarme a seguir adelante, por no dejar que baje los brazos, sin tu apoyo durante estos últimos meses, no creo que esto hubiese sido posible, gracias por ser tan buena amiga y persona.

Gracias mi amor, por acompañarme, entenderme y aguantarme durante estos años. Gracias por ser mi sostén, mi compañero, y mi compinche; por caminar a mi lado, enfrentando cada obstáculo que se nos presenta, superando cada prueba acuática, terrenal y pedregosa. Gracias por ayudarme en todo lo que está a tu alcance y más también, por mover cielo y tierra para que yo esté bien. Sin vos esto no hubiese sido posible.

RESUMEN

El objetivo principal de la presente tesis consiste en contribuir al estudio y la valoración comercial y nutricional del trigo argentino, mediante la evaluación de sus perfiles químicos característicos y sus propiedades antioxidantes.

En una primera parte, se planteó encontrar modelos que permitieran asegurar el origen de trigos argentinos (trazabilidad química) mediante la evaluación del perfil multi-elemental y el patrón isotópico del mismo. Se analizaron 80 muestras de trigo, 130 de suelo y 120 de agua, provenientes de tres regiones (Buenos Aires, Córdoba y Entre Ríos). La composición multi-elemental fue establecida por ICP-MS, $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ se midieron por espectrometría de masas de isótopos estables, y la relación $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ fue determinada usando un espectrómetro de masas de ionización térmica (TIMS). El estudio de 36 variables (Al, B, Ba, Ca, Cd, Ce, Co, Cs, Cu, Eu, Ga, K, La, Li, Lu, Mg, Mn, Mo, Na, Nd, Ni, Pb, Rb, Se, Sm, Sr, Tl, U, V, Yb, Zn, K/Rb, Ca/Sr, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ y $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$), a través de métodos estadísticos multivariados (análisis de conglomerados, análisis de componentes principales y análisis discriminante) demostró que es posible la discriminación geográfica de las muestras de suelo, agua y trigo, siendo las variables más importantes para dicha diferenciación: K/Rb, Ca/Sr, Ba, $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, Co, Mo, Zn, Mn, Eu, $\delta^{13}\text{C}$ y Na.

La variabilidad de muestras de trigo procedentes de distintas regiones geográficas se debe a la absorción de minerales del suelo donde se cultiva y el agua con que se irriga. El análisis de procrustes generalizado (APG) mostró 99,2 % de consenso entre muestras de suelo, agua y trigo provenientes de la misma región, mientras que el análisis de correlación canónica (ACC) demostró una correlación significativa entre los perfiles elementales e isotópicos de trigo y los correspondientes a suelo y agua ($r^2 = 0,97$, $p < 0,001$ y $r^2 = 0,96$, $p < 0,001$, respectivamente). Estos resultados demuestran que la composición multi-elemental e isotópica del trigo se relaciona directamente con las características del suelo y del agua de riego del sitio de crecimiento, por lo que estos parámetros podrían ser utilizados para trazar el origen del mismo, repercutiendo en mejoras en el acceso a los mercados así como en el rendimiento económico de este producto.

Respecto a la valoración nutricional del trigo, el estudio se orientó hacia la identificación de aquellos genotipos con mayor capacidad antioxidante (CA), para lo cual se estudió el contenido de polifenoles totales (PT); el perfil de compuestos polifenólicos por HPLC-DAD-ESI-QTOF; y la capacidad antioxidante (CA), determinada por métodos *in vitro* (TEAC y FRAP) e *in vivo* (*S. cerevisiae*), tanto en la fracción libre (FL) como en la fracción unida (FU) de extractos de trigo argentino. Se utilizaron 12 variedades de trigos (ACA 303, ACA 315, ACA 320, ACA 903 B, BUCK 75 ANIVERSARIO, Cronox, BIOINTA 3004, BAGUETTE PREMIUM 11, LE 2330, KLEIN CAPRICORNIO, KLEIN GUERRERO y KLEIN YARARÁ), procedentes de 4 zonas delimitadas por el INTA (SUB I, SUB IIN, SUB IV y SUB VN), durante dos años de producción (2009 y 2010). En cuanto al contenido de PT, las

variedades ACA 303, ACA 315, ACA 320 y ACA 903 B presentaron los valores más altos. El estudio del perfil de polifenoles permitió identificar 25 compuestos, siendo los ácidos diferúlico (ADF) y los compuestos: ácido 2-hidroxi-3-O- β -D-glucopiranosilbenzoico, *p*-coumaroil-feruloilputrescina, glucósido de ácido hidroxibenzoico, 6-C-glucosil-8-C-arabinosil-apigenina, ácido *trans*-ferúlico y ácido *cis*-ferúlico, los más importantes para la discriminación entre diferentes variedades de trigo. Las variedades ACA 315 y KLEIN GUERRERO mostraron los valores más altos de ADF, mientras que LE 2330, KLEIN CAPRICORNIO y BIOINTA 3004 mostraron los valores más bajos.

La determinación de la CA *in vitro* también mostró diferencias significativas entre las variedades de trigo analizadas, siendo la variedad ACA 315 la que presentó los valores más altos de CA, y las variedades BIOINTA 3004 y KLEIN CAPRICORNIO las que mostraron los valores más bajos. No obstante, en el estudio de la CA *in vivo*, fue la variedad BIOINTA 3004 la que mostró valores más altos, pese a tener menores cantidades de compuestos polifenólicos. A través del análisis de correlación canónica (ACC) y de *boosted regression trees* (BRT), se estudió la influencia del perfil de compuestos polifenólicos sobre la CA evaluada a través de TEAC, FRAP y % de sobrevida, encontrando que los compuestos más importantes para explicar los resultados son: ácido 2-hidroxi-3-O- β -D-glucopiranosilbenzoico, diglucósido de ácido hidroxibenzoico, crisoiol-6,8-di-C-pentosido, ácido *trans*-ferúlico, derivado de ác. ferúlico, ácido *cis*-ferúlico y los isómeros 1, 4, 5, 9 y 10 de ADF.

Conjuntamente, se buscó determinar el efecto de la elaboración y posterior cocción de fideos integrales secos a partir de harina integral, sobre el contenido de PT, el perfil de compuestos polifenólicos y la CA. Los resultados obtenidos mostraron que en las etapas de amasado, laminado y secado, se produce una disminución de la CA y de los compuestos polifenólicos, tanto en la FL como en la FU, mientras que la cocción de la pasta produce un aumento de la CA y de los polifenoles individuales con respecto a harina, mejorando su disponibilidad, particularmente de aquellos derivados de ácido ferúlico asociados a la FU.

Finalmente, se planteó realizar una aproximación al modo en que los antioxidantes presentes en un alimento procesado ejercen su efecto sobre el organismo humano. Para ello se estudió la estabilidad de los compuestos antioxidantes de fideos integrales cocidos, utilizando un modelo experimental *in vitro* simulando la digestión gastrointestinal humana y posterior absorción a través de una membrana de diálisis. Los resultados obtenidos mostraron que 5 de los 12 compuestos cuantificados en la FL de fideos cocidos (diglucósido de ácido hidroxibenzoico, glucósido de ácido hidroxibenzoico, triptófano, isómero 6 de ADF y ácido *trans*-ferúlico), atravesaron la membrana de diálisis, sugiriendo que podrían estar disponibles para ser absorbidos por el intestino delgado. Por el contrario, el resto de los compuestos polifenólicos, particularmente los encontrados en la FU, no lograron atravesar la membrana. Esta fracción de polifenoles unidos mostró una mayor CA *in vitro* que aquellos capaces de atravesar la membrana de diálisis, sugiriendo que podrían tener algún tipo de función en el colon.

En su conjunto, los resultados obtenidos permiten concluir que el estudio del perfil elemental e isotópico, junto con el análisis de estadística multivariada, conforman una herramienta útil para verificar la autenticidad y el origen geográfico de trigo, reforzando el concepto de trazabilidad química, presuponiendo un aporte interesante para su comercialización. Por otro lado, se demuestra el valor nutricional del trigo como fuente de compuestos antioxidantes, señalando la necesidad de conocer la composición cuali-cuantitativa de los componentes que contribuyen a la capacidad antioxidante.

ABSTRACT

The aim of this thesis is to contribute to the study of Argentine wheat as well as its commercial and nutritional value, through the evaluation of its characteristic chemical profiles together with its antioxidant properties.

In the first part, the work consisted in finding models to ensure the origin of Argentine wheat (chemical traceability) through the evaluation of its multi-elemental profile as well as its isotopic pattern. Eighty wheat samples, 130 soil samples and 120 water samples from three Argentinean regions (Buenos Aires, Córdoba and Entre Ríos) were analyzed. Elemental composition was established by ICP-MS, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ were measured by isotopic ratio mass spectrometry, while $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ratio was determined using thermal ionization mass spectrometer (TIMS). Thirty-six variables were measured (Al, B, Ba, Ca, Cd, Ce, Co, Cs, Cu, Eu, Ga, K, La, Li, Lu, Mg, Mn, Mo, Na, Nd, Ni, Pb, Rb, Se, Sm, Sr, Tl, U, V, Yb, Zn, K / Rb, Ca / Sr, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ and $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$), and processed with multivariate statistical methods (cluster analysis, principal component analysis and discriminant analysis) showing that geographical discrimination of soil, water and wheat samples is possible. The most important variables for this differentiation were K/Rb, Ca/Sr, Ba, $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, Co, Mo, Zn, Mn, Eu, $\delta^{13}\text{C}$ and Na.

The variability of wheat samples from different geographical regions is due to the absorption of minerals from the soil and the irrigation water where it is cultivated. The Generalized Procrustes Analysis (APG) showed 99.2% of consensus between soil, water and wheat samples from the same geographical region, while the Canonical Correlation Analysis (CCA) demonstrated a significant correlation between the elemental and isotopic profiles of wheat and their corresponding soil and water profiles ($r^2 = 0.97$, $p < 0.001$ and $r^2 = 0.96$, $p < 0.001$, respectively). These results demonstrate that multi-elemental and isotopic composition of wheat is directly related to the characteristics of soil and irrigation water from the area where it is grown. Therefore, these parameters could be used to trace the origin of wheat, leading to improve the access to international markets as well as the economic performance of this product.

Regarding the nutritional value of wheat, the study was directed to the identification of genotypes with higher antioxidant capacity (AC), analyzing the total polyphenol content (PT), the polyphenolic compounds profile by HPLC-DAD-ESI-QTOF, and the antioxidant capacity (CA), as determined by *in vitro* (FRAP and TEAC) and *in vivo* (*S. cerevisiae*) methods, in free and bound fractions (FL and FU, respectively) of Argentinean wheat extracts. Twelve varieties of wheat were analyzed with this purpose (ACA 303, ACA 315, ACA 320, ACA 903 B, BUCK 75 ANIVERSARIO, Cronox, BIOINTA 3004, BAGUETTE PREMIUM 11, LE 2330, KLEIN CAPRICORNIO, KLEIN GUERRERO and KLEIN YARARÁ), from 4 areas enclosed by INTA (SUB I, IIN SUB, SUB IV and SUB VN), of two years of production (2009 and 2010). As concerns to the content of PT, the varieties ACA 303, ACA 315, ACA 320 and ACA 903 B

showed the highest values. The study of polyphenolic profile allowed to identifying 25 compounds. Diferulic acids (DFA), together with 2-hydroxy-3-O- β -D-glucopyranosylbenzoic acid, *p*-coumaroyl-feruloylputrescin, hydroxybenzoic acid glycoside, 6-C-glucosyl-8-C-arabinosyl-apigenin, *trans*-ferulic acid and *cis*-ferulic acid, were the most important compounds contributing to discrimination between different wheat varieties. ACA 315 and KLEIN GUERRERO showed the highest values of ADF, while LE 2330, BIOINTA 3004 and KLEIN CAPRICORNIO had the smallest values.

In vitro AC also showed significant differences among wheat varieties analyzed. ACA 315 had the highest values of AC, while BIOINTA 3004 and KLEIN CAPRICORNIO showed the lowest. On the other hand, the study of *in vivo* AC, presented different results, with BIOINTA 3004 showing the highest values, despite having lower amounts of polyphenolic compounds. The influence of polyphenolic profile on the AC (TEAC, FRAP and % survival) was studied through Canonical Correlation Analysis (CCA) and Boosted Regression Trees (BRT), finding that the most important compounds to explain these results were: 2-hydroxy-3-O- β -D-glucopyranosylbenzoic acid, hydroxybenzoic acid diglycoside, crisoeriol-6,8-di-C-pentoside, *trans*-ferulic acid, ferulic acid derivative, *cis*-ferulic acid and 1, 4, 5, 9 and 10 isomers of DFA.

Along with the evaluation of *in vitro* and *in vivo* AC, the determination of the effect of processing and cooking of dry grain noodles from whole meal flour was studied, concerning the content of PT, the polyphenolic compounds profile as well as AC. The results showed that kneading, rolling and drying stages, cause a decrease of AC and polyphenolic compounds in both fractions (FL and FU), while cooking produces an increase in AC and individual polyphenols comparing with flour, improving its availability, especially those ferulic acid derivatives associated to FU.

Finally, it was planned to develop an approach to the way that antioxidants of a processed food exert their effect on the human body. With this purpose, the stability of antioxidant compounds found in cooked noodles was studied using an *in vitro* experimental model of simulating human gastro-intestinal digestion and subsequent absorption through a dialysis membrane. The results showed that 5 of the 12 compounds quantified in FL of cooked noodles (hydroxybenzoic acid diglycoside, hydroxybenzoic acid glycoside, tryptophan, DFA 6 isomer and *trans*-ferulic acid), went through the dialysis membrane, suggesting that they might be available to be absorbed by the small intestine. On the contrary, the rest of polyphenolic compounds, particularly those found in FU, failed to pass through the membrane. This fraction of bound polyphenols showed higher *in vitro* AC than those able to cross the dialysis membrane, suggesting that they might have some kind of function in the colon.

As a whole, the results lead to the conclusion that the study of elemental and isotopic profile along with the use of multivariate statistical tools, constitute a useful tool to verify the authenticity and geographical origin wheat, reinforcing the concept of chemical traceability, assuming an interesting contribution for its commercialization. On the other

hand, the nutritional value of wheat as a source of antioxidant compounds has been demonstrated, pointing to the importance of knowing the qualitative and quantitative composition of the substances that contribute to the antioxidant capacity.

INDICE

ABREVIATURAS.	1
INTRODUCCIÓN GENERAL.	5
OBJETIVOS.	9
CAPÍTULO 1: COMPOSICIÓN MULTI-ELEMENTAL E ISOTÓPICA DE SUELO, AGUA Y TRIGO PARA DIFERENCIAR PROCEDENCIA.	12
1.1. Introducción.	13
1.1.1. Métodos analíticos para determinar el origen de los alimentos.	15
1.1.1.1. Composición multi-elemental.	16
1.1.1.2. Análisis isotópico.	17
1.2. Materiales y Métodos.	22
1.2.1. Estándares y Reactivos.	22
1.2.2. Muestreo.	23
1.2.2.1. <i>Trigo.</i>	24
1.2.2.2. <i>Suelo.</i>	24
1.2.2.3. <i>Agua.</i>	24
1.2.3. Análisis Multi-elemental.	25
1.2.3.1. <i>Preparación de las muestras.</i>	25
1.2.3.2. <i>Determinación.</i>	26
1.2.4. Análisis de isótopos estables ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$).	27
1.2.4.1. <i>Preparación de las muestras.</i>	27
1.2.4.2. <i>Determinación.</i>	27
1.2.5. Análisis isotópico del estroncio.	27
1.2.5.1. <i>Preparación de las muestras.</i>	28
1.2.5.2. <i>Separación cromatográfica del estroncio (Sr).</i>	28
1.2.5.2. <i>Determinación.</i>	29
1.2.6. Tratamiento estadístico de los datos.	29
1.3. Descripción y discusión de los resultados.	31
1.3.1. Caracterización del área de muestreo.	31
1.3.1.1. <i>Análisis de la composición del suelo.</i>	31
1.3.1.2. <i>Análisis de la composición del agua de riego.</i>	34
1.3.2. Caracterización de trigo argentino.	37
1.3.2.1. <i>Análisis Multi-elemental.</i>	39
1.3.2.2. <i>Composición isotópica.</i>	40
1.3.2.3. <i>Discriminación geográfica de trigo por tratamiento multivariado.</i>	42

1.3.3.	Correlación entre la composición multi-elemental e isotópica de muestras de suelo, agua y trigo.	48
1.4.	Conclusiones.	52
CAPÍTULO 2: PERFIL DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EN TRIGO DE DISTINTO GENOTIPO Y PROCEDENCIA.		53
2.1.	Introducción.	54
2.2.	Materiales y Métodos.	58
2.2.1.	Estándares y Reactivos.	58
2.2.2.	Muestreo.	58
2.2.3.	Extracción de polifenoles.	60
2.2.3.1.	<i>Extracción de polifenoles libres (Fracción Libre).</i>	60
2.2.3.2.	<i>Extracción de polifenoles unidos (Fracción Unida).</i>	60
2.2.4.	Determinación de compuestos polifenólicos.	61
2.2.4.1.	<i>Contenido de polifenoles totales - Técnica de Folin Ciocalteu.</i>	61
2.2.4.2.	<i>Determinación del perfil de polifenoles por HPLC-DAD-ESI-QTOF.</i>	62
2.2.5.	Tratamiento estadístico de los datos.	64
2.3.	Descripción y discusión de los resultados.	65
2.3.1.	Contenido de polifenoles totales (PT).	65
2.3.2.	Caracterización del perfil de polifenoles por HPLC-DAD-ESI-QTOF.	67
2.3.2.1.	<i>Derivados de ácidos hidroxibenzoicos.</i>	70
2.3.2.2.	<i>Ácidos hidroxicinámicos y sus derivados.</i>	72
2.3.2.3.	<i>Flavonas.</i>	78
2.3.3.	Cuantificación de compuestos polifenólicos.	79
2.3.4.	Discriminación entre distintas variedades de trigo. Influencia de la zona y el año de producción.	84
2.4.	Conclusiones.	90
CAPÍTULO 3: CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE TRIGOS DE DISTINTO GENOTIPO Y PROCEDENCIA.		91
3.1.	Introducción.	92
3.2.	Materiales y Métodos.	97
3.2.1.	Estándares y Reactivos.	97
3.2.2.	Muestras.	97
3.2.3.	Extracción de polifenoles.	97
3.2.4.	Determinación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i> .	97
3.2.4.1.	<i>Capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC).</i>	98

3.2.4.2.	<i>Poder antioxidante de reducción del ion férrico (FRAP).</i>	99
3.2.5.	Determinación de la capacidad antioxidante <i>in vivo</i> . Ensayo de sobrevida en la levadura <i>S. cerevisiae</i> .	101
3.2.6.	Tratamiento estadístico de los datos.	102
3.3.	Descripción y discusión de los resultados.	104
3.3.1.	Evaluación de la capacidad antioxidante en distintas variedades de trigo.	104
3.3.1.1.	<i>Métodos químicos in vitro.</i>	104
3.3.1.2.	<i>Ensayo de sobrevida de S. cerevisiae.</i>	109
3.3.2.	Correlación entre CA <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> con el contenido de compuestos polifenólicos.	115
3.3.2.1.	<i>Influencia de los compuestos polifenólicos sobre CA in vitro.</i>	115
3.3.2.2.	<i>Influencia de los compuestos polifenólicos sobre CA in vivo.</i>	122
3.4.	Conclusiones.	127
 CAPÍTULO 4: FIDEOS INTEGRALES: CAMBIOS EN LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DURANTE SU ELABORACIÓN Y DIGESTIÓN GASTRO-INTESTINAL IN-VITRO.		128
4.1.	Introducción.	129
4.2.	Materiales y Métodos.	132
4.2.1.	Estándares y Reactivos.	132
4.2.2.	Muestras.	132
4.2.3.	Elaboración de fideos integrales.	132
4.2.4.	Extracción de polifenoles.	134
4.2.5.	Bioaccesibilidad de polifenoles presentes en fideos integrales cocidos.	134
4.2.6.	Determinación de compuestos polifenólicos.	135
4.2.6.1.	<i>Contenido de polifenoles totales (PT).</i>	135
4.2.6.2.	<i>Determinación del perfil de polifenoles por HPLC-DAD-ESI-QTOF.</i>	135
4.2.7.	Determinación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i> .	136
4.2.8.	Tratamiento estadístico de los datos.	136
4.3.	Descripción y discusión de los resultados.	137
4.3.1.	Elaboración de fideos integrales.	137
4.3.2.	Bioaccesibilidad de polifenoles tras simular una digestión gastro-intestinal.	144
4.4.	Conclusiones.	149
 CONCLUSIONES FINALES.		150

ANEXO I.		153
1.	Quimiometría.	154
1.1.	Estadística descriptiva.	154
1.2.	Estadística inductiva: Análisis de la Varianza.	154
1.3.	Estadística Multivariada.	155
1.3.1.	Análisis multivariado exploratorio.	155
1.3.1.1.	<i>Análisis de correlación simple (ACSP).</i>	155
1.3.1.2.	<i>Análisis de conglomerados (AC).</i>	155
1.3.1.3.	<i>Análisis de componentes principales (ACP).</i>	156
1.3.1.4.	<i>Análisis de Procrustes Generalizado (APG).</i>	156
1.3.2.	Análisis multivariado clasificatorio: Análisis discriminante (AD).	156
1.3.3.	Análisis multivariado cuantitativo.	157
1.3.3.1.	<i>Análisis de correlación canónica (ACC).</i>	157
1.3.3.2.	<i>Boosted regression tres (BRT).</i>	158
ANEXO II.		159
BIBLIOGRAFÍA.		162
PUBLICACIONES LOGRADAS DURANTE LA TESIS.		179



**ABREVIATURAS Y
SÍMBOLOS**

Á: Armstrong.
ABS: Sub-muestra de compuestos fenólicos biodisponibles.
ác.: ácido.
AC: Análisis de Conglomerados.
ACC: Análisis de Correlación Canónica.
ACP: Análisis de Componentes Principales.
ACSP: Análisis de Correlación Simple de Pearson.
ACV: Ataques cerebro vascular.
AD: Análisis Discriminante.
ADF: Ácidos diferúlicos.
ADN: Ácido deoxiribonucleico.
ADS: Análisis Discriminante paso a paso “*Stepwise*”.
AHB: Ácidos hidroxibenzoicos.
AHC: Ácidos hidroxicinámicos.
APG: Análisis de Procrustes Generalizado.
ar: Abundancia relativa.
ARN: Ácido ribonucleico.
BOC: Sub-muestra de la digestión bucal.
BRT: Boosted Regression Trees.
CA: Capacidad antioxidante.
CAT: Enzima catalasa.
CN: Control negativo.
CPo: Control positivo.
CP: Componente principal.
CPB: Cromatograma del Pico Base.
DAD: Detector de arreglo de diodos.
EAG: Equivalente al Ácido Gálico.
EE: Error estándar.
EROs: Especies reactivas de oxígeno.
ERNs: Especies reactivas de nitrógeno.
ERSs: Especies reactivas de azufre.
ESI: Ionización por electrospray.
ET: Equivalentes de Trolox.
FAAS: Espectrofotómetro de absorción atómica de llama.
FRAP: Poder antioxidante de reducción del ión férrico.
FL: Fracción libre de polifenoles.
FLs: Fracciones libres de polifenoles.
FU: Fracción unida de polifenoles.
FUs: Fracciones unidas de polifenoles.
FVA: Flavona.

GAS: Sub-muestra de la digestión gástrica.
GSHPx: Enzima Glutación peroxidasa.
G-6-PDH: Enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
GSH: Glutación.
GSHR: Enzima glutación reductasa.
h: Hora/s.
HAT: Transferencia de un átomo de hidrógeno.
HCl: Ácido clorhídrico.
HO•: Radical hidroxilo.
HO₂•: Radical hidroperoxilo.
H₂O₂: Peróxido de hidrogeno.
HOCl: Ácido hipocloroso.
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.
ICP-MS: Espectrómetro de masas con plasma de acoplamiento inductivo.
INASE: Instituto nacional de semillas.
INT: Sub-muestra del interior de la membrana de diálisis.
LC: Límite de cuantificación.
LD: Límite de detección.
LDL: Lipoproteínas de baja densidad.
MCR: Material certificado de referencia.
Min: Minutos.
m: Metro/s.
mm: Milímetro.
MS/MS: Espectrometría de masas.
MTT: Metil tiazolil tetrazolium.
m/z: Relación masa/carga.
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido.
NADP⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado.
ng/L: Nano-gramos por litro.
Nm: Nanómetro.
Nº: Número.
NO: Óxido nítrico.
O₂: Oxígeno molecular.
¹O₂: Oxígeno singlete.
O₂^{•-}: Anión radical superóxido.
ONOO⁻: Peroxinitrito.
Ppm: Partes por millón.
ppt: Partes por trillón.
PT: Polifenoles Totales.
PTT: Polifenoles totales de FL + FU.

p/v: Dilución peso en volumen.
ICP-MS: Plasma de acoplamiento inductivo.
QTOF: Analizador de cuadrupolo y tiempo de vuelo.
RET: Red de Ensayos Comparativos de Cultivares de Trigo Pan.
rpm: Revoluciones por minuto.
SET: Transferencia de un electrón.
SAGPyA: Secretaría de agricultura, ganadería, pesca y alimentación de la nación.
SOD: Enzima superóxido dismutasa.
TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.
TCC: Tecnología de celda de colisión.
TEAC: Capacidad antioxidante equivalente al trolox.
TIMS: Espectrómetro de Masas de Ionización Térmica.
TPTZ: 2,4,6,-tripiridil-s-triazina.
TR: Tiempo de retención.
uma: Unidad de masa atómica.
USD: Dólares.
UV: Ultravioleta.
V: Voltios.
v/v: Dilución volumen en volumen.



INTRODUCCIÓN

La autenticidad y procedencia de los productos alimenticios, junto con su calidad nutricional, son temas de gran interés en la industria alimentaria, que no solo atañe a consumidores, sino también a productores y distribuidores. Los consumidores buscan cada vez mayores referencias sobre los alimentos que adquieren y, por consiguiente, cobran mayor relevancia su valor nutricional, su origen, sistemas y procesos de producción, tradiciones productivas y culinarias, carácter artesanal o étnico, etc.

Entre los productos que están siendo objeto de estudio para verificar su autenticidad y procedencia por parte de la Unión Europea se encuentra el trigo y sus derivados. Los principales productores de trigo en el mundo son la Unión Europea como bloque, seguida por China, India y Estados Unidos (**Figura I**). La Unión Europea, China y la India representan en promedio el 53 % de la producción mundial de trigo, mientras que Estados Unidos representa el 9,4 %. Por otro lado, en América Latina, destaca la participación de Argentina como productor mundial de trigo, cuya producción mundial promedio es del 2 % (FAO, 2014).

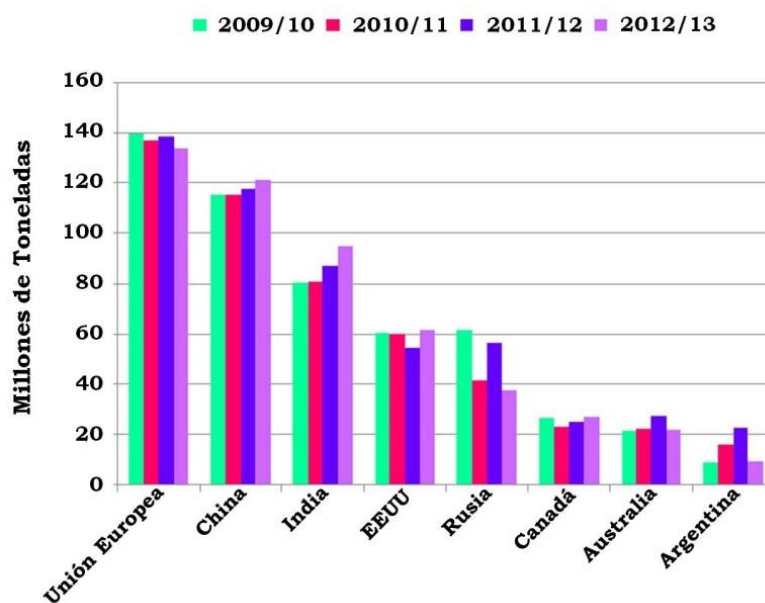


Figura I. Principales productores mundiales de trigo. Fuente: FAO (2014).

De las 655,5 millones de toneladas de trigo producidas mundialmente en la última cosecha (2012-2013), 14,5 millones de toneladas se produjeron en Argentina, con una superficie cultivada de 4,6 millones de hectáreas (Barberis, 2014). Las principales provincias productoras en nuestro país son Buenos Aires con 2 millones de hectáreas plantadas y 6,5 millones de toneladas producidas en la última campaña, le sigue Córdoba, con 500 mil hectáreas y 1,2 millones de toneladas y Santa Fe con 400 mil hectáreas y una

producción de 1,2 millones de toneladas. La **Figura II** muestra la contribución de cada provincia a la producción nacional de trigo.

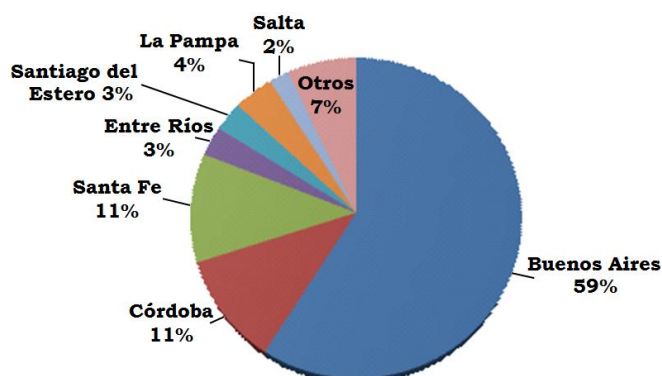


Figura II. Porcentaje de participación de las provincias argentinas en la producción nacional de trigo, promedio 2008/09-2012/13. Fuente: SIIA (2014).

Aproximadamente el 40 % de los granos producidos en nuestro país es destinado al consumo interno, mientras que el 60 % restante se exporta. El principal comprador de granos de trigo argentinos es Brasil, que adquiere el 50 % de lo que se exporta, pero también hay exportaciones a países de África, como Marruecos o Sudáfrica, y a otros países latinoamericanos como Perú o Colombia.

El trigo es un cereal muy importante a nivel nacional, ya que representa el 4 % de las exportaciones totales del país (Barberis, 2014), permitiendo un ingreso anual de 3.300 millones de dólares.

Desde los años 70 hasta la actualidad, se ha registrado un aumento considerable (59 % aproximadamente) en la producción nacional de este cereal gracias a los avances tecnológicos que permitieron un incremento en los rendimientos, y por otro lado también se registró un aumento en la exportación de 130 % desde el año 2001 hasta la fecha (Barberis, 2014).

Debidos a las exigencias internacionales, este crecimiento necesita ir acompañado de estudios científicos que apoyen la comercialización de este cereal bajo estándares de calidad internacionales y certificando el origen del mismo por métodos que permitan establecer diferencias con aquellos procedentes de otras regiones.

Por otro lado, corresponde considerar que actualmente las propiedades funcionales de los alimentos son de gran interés por sus implicancias en la salud humana. En particular, la acción antioxidante es una de las funciones fisiológicas más estudiadas en los alimentos, debido a la protección que brinda a los organismos vivos frente al daño oxidativo

en células y tejidos. Por esta razón, en la actualidad se trabaja en la búsqueda de alimentos naturales ricos en compuestos antioxidantes, y en la evaluación de los mecanismos por los cuales ejercen su acción antioxidante.

Dentro de las principales fuentes de antioxidantes se destacan las frutas, las verduras y los cereales. Algunos estudios epidemiológicos sugieren que el consumo de 3 o más raciones diarias de cereales integrales se asocia con la reducción de enfermedades cardiovasculares, diabetes de tipo 2 y cáncer de colon (Jonnalagadda *et al.*, 2011; Lang & Jebb, 2003). Como se mencionó anteriormente, dentro de los cereales más importantes consumidos en el mundo se destaca el trigo. En las últimas décadas todos los esfuerzos han sido dirigidos a mejorar la producción y calidad de procesamiento del trigo sin prestar mucha atención a los aspectos nutricionales, sin embargo, en la actualidad se busca mejorar el conocimiento sobre las propiedades antioxidantes del mismo.

Se sabe que el genotipo, las condiciones de cultivo, y la interacción genotipo con el ambiente, afectan las propiedades antioxidantes en el grano de trigo (Moore, 2006). También hay algunas evidencias de que el procesamiento produce cambios en la capacidad antioxidante de alimentos elaborados a partir de trigo (Fares *et al.*, 2008; Fares *et al.*, 2010). Sin embargo, son pocos los estudios que evalúan las propiedades antioxidantes del trigo o de productos derivados de este sobre organismos vivos. Es muy escasa la información reportada sobre el poder antioxidante *in vivo*, y los mecanismos de acción a nivel celular, de los compuestos inmersos en una matriz tan compleja como la de un alimento, en donde el poder antioxidante está influenciado por la combinación sinérgica, antagónica o aditiva de dichos compuestos y por los efectos de matriz. Es por esto que determinar las propiedades antioxidantes del trigo y los mecanismos de acción por los cuales los compuestos antioxidantes presentes en él ejercen sus efectos, a través de modelos biológicos experimentales, es importante para entender la función biológica de estos compuestos.

Como resumen de lo expuesto en los párrafos anteriores, se puede decir que el trigo necesita ser evaluado para certificar su autenticidad y procedencia, y también para valorar sus propiedades nutricionales, con el fin de mejorar la certeza de los consumidores sobre el origen y las cualidades nutricionales del mismo.

The image features a background of a wheat field under a bright sky. A vertical green bar on the right side contains a close-up of a wheat ear. The word "OBJETIVOS" is written in green, bold, uppercase letters in the lower right quadrant.

OBJETIVOS

Esta tesis busca contribuir a la valoración comercial y nutricional de trigo argentino mediante una evaluación de su perfil químico característico y sus propiedades antioxidantes. Se espera que el conocimiento del perfil químico contribuya a afirmar/garantizar el origen del mismo (trazabilidad química), mientras que la evaluación de las cualidades antioxidantes permita aportar a la re-valoración del mismo, aportando nuevos conocimientos a la ciencia de los alimentos en este campo (eficiencia comprobable de alimentos para disminuir el estrés oxidativo).

A partir de esto se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Obtener un perfil químico e isotópico de trigos argentinos con el propósito de construir una “huella dactilar” (*fingerprint*) que ayude a asegurar el origen de los mismos, diferenciándolos de trigos de otra procedencia. Esta huella dactilar considerará tanto la composición multi-elemental como el patrón de isótopos estables ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ y $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$). Adicionalmente, se busca demostrar la conexión entre la composición química-isotópica en trigos, suelo y agua procedentes de la misma región geográfica, aplicando diferentes herramientas quimiométricas. En este punto, la hipótesis de trabajo presupone que un mismo alimento producido en distintas regiones tendrá un sello o perfil característico, a partir de lo cual se podrá verificar su procedencia geográfica mediante la evaluación de su perfil químico, dando origen al concepto de trazabilidad química de alimentos (**Capítulo 1**);
- Caracterizar y cuantificar los compuestos polifenólicos presentes en distintas variedades de trigo argentino, procedentes de regiones diferentes. Esto apunta a mejorar el conocimiento de las cualidades nutricionales del trigo argentino, identificando las variedades con mayor contenido en compuestos polifenólicos. Estos hallazgos promoverían el estudio a futuro de la base genética de los caracteres asociados a la generación de estos compuestos, para desarrollar estrategias de selección en los programas de mejoramiento genético (**Capítulo 2**);
- Estudiar la acción antioxidante de distintas variedades de trigo argentino utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*. Con esto se busca aportar al conocimiento de la acción que los alimentos ricos en antioxidantes tendrían sobre sistemas biológicos, como una manera de predecir posibles respuestas en humanos que consuman tales alimentos. (**Capítulo 3**);
- Conocer el cambio en el perfil de compuestos polifenólicos durante la elaboración y cocción de fideos integrales secos. Particularmente, se busca estudiar cuáles son los compuestos antioxidantes (polifenoles) que se degradan o aumentan en el proceso de cocción de fideos integrales. La evaluación del cambio en el perfil de polifenoles, sumado

a la medición del poder antioxidante por técnicas como TEAC o FRAP permitiría entender las razones del cambio en la capacidad antioxidante de productos derivados del trigo sometidos a cambios tecnológicos, desde la harina hasta la cocción, incluyendo el proceso de amasado, laminado y secado (**Capítulo 4**);

- ↪ Para complementar el objetivo anteriormente expuesto, se buscará avanzar sobre el conocimiento de la estabilidad y bioaccesibilidad de los antioxidantes (polifenoles) presentes en un alimento procesado (fideos integrales cocidos), evaluando los cambios en el perfil de polifenoles utilizando un modelo *in vitro* que simula la digestión gastrointestinal humana y el posterior proceso de absorción intestinal (**Capítulo 4**).



CAPÍTULO 1

***COMPOSICIÓN MULTI-ELEMENTAL E ISOTÓPICA
DE SUELO, AGUA Y TRIGO PARA DIFERENCIAR
PROCEDENCIA.***

1.1. INTRODUCCIÓN.

En los últimos años, el desarrollo de la globalización, el descubrimiento de contaminantes en los alimentos (metales pesados, pesticidas, fármacos, entre otros), la aparición de enfermedades relacionadas con estos contaminantes (cáncer, diabetes, celiaquía, enfermedades cardiovasculares, etc.), y las nuevas tecnologías de modificación genética en alimentos de origen vegetal o animal, han provocado una gran preocupación por parte de los consumidores por saber lo que ingieren.

Los consumidores han elevado y diversificado el grado de exigencia por los alimentos que consumen en virtud del aumento de su poder de negociación en las compras, de la cantidad de información disponible, y de la oferta de una gran variedad de productos. Garantizar la calidad de un alimento y poder verificar su origen es actualmente una necesidad para los productores y distribuidores, ya que esto les permite generar productos de valor diferencial, promover la venta de estos en mercados específicos más rentables y, especialmente, brindar confianza a los consumidores.

La **calidad de un alimento** está determinada por el cumplimiento de los requisitos legales y comerciales (buenas prácticas de manufactura, certificación bajo normas de calidad ISO, IRAM, etc.), la satisfacción del consumidor y la producción en un ciclo de mejora continua. Cuando en la industria alimentaria se habla de calidad de un alimento significa que obtuvieron un producto que se aproxima a un estándar previamente determinado, que puede vincularse con atributos organolépticos (sabor, aroma, color, textura, etc.), nutricionales (naturalmente presentes o incorporados a los alimentos), funcionales (facilidad de uso, transporte y conservación por parte de clientes y consumidores) y comerciales (identificación, rotulado, aspectos sanitarios, entre otros). No todos estos factores están establecidos por la legislación alimentaria, son más bien requisitos impuestos por la cadena de comercialización, fuertemente influenciados por los gustos y costumbres de los consumidores. Actualmente, en Europa y otros países, que requieren garantizar la calidad, inocuidad, genuinidad y seguridad de los alimentos que consumen, se han establecido como requisito de calidad y genuinidad la exigencia de certificación de procedencia de los alimentos.

La confirmación de la genuinidad de un alimento se conoce como **autenticación de alimentos**. El término auténtico generalmente se define como “confiable, de origen reconocido, genuino”. Confirmar la autenticidad/genuinidad de un alimento ayuda a garantizar sus características y su calidad, y también evita adulteraciones (fraudes) o la confusión de los consumidores debido a un rotulado inadecuado.

Desde sus orígenes, la legislación alimentaria ha custodiado la seguridad de los alimentos, estableciendo parámetros microbiológicos, físicos y químicos que los mismos deben cumplir para ser considerados aptos para el consumo humano. En los últimos años, en especial a nivel internacional, ha aumentado la legislación con respecto a la autenticidad de un alimento, como una forma de proteger al consumidor, evitando que recaiga en

propagandas y rótulos fraudulentos. La metodología para autenticar un alimento en general requiere del conocimiento profundo del mismo, ya que pocos alimentos son sustancias puras; en general son mezclas de componentes mayoritarios claramente definidos (agua, proteínas, grasas, azúcares, minerales mayoritarios), a los cuales se suma una mezcla de varios ingredientes menores. El mismo producto puede mostrar pequeñas variaciones dependiendo de su origen botánico, sus particularidades de origen geográfico (en relación a la región donde fue cultivada/criada la materia prima con que se elaboró) y, en menor grado, de cómo ha sido procesado. Para confirmar la autenticidad de un alimento se puede optar por tener una base de datos que contemple todas las variantes posibles, ya sea en los componentes mayoritarios como en los ingredientes minoritarios; otra alternativa es establecer modelos predictivos, basados en la identificación de elementos que asocien suelo, agua, ambiente y otros elementos del lugar de origen con la composición final del alimento, sin dejar de considerar las modificaciones que la composición de la materia prima puede sufrir como consecuencia de las operaciones tecnológicas de producción (molienda, mezcla, cocción, etc.).

En consecuencia, es necesario desarrollar y estandarizar métodos que garanticen la calidad y la autenticidad, tanto para la detección de fraudes como para lograr una diferenciación del producto en términos de comercialización. En este contexto, el nombre regional del producto juega un rol muy importante, particularmente en alimentos asociados a una región específica que ha desarrollado y comercializado un estándar particular de calidad. Los alimentos de una dada región pueden tener un precio considerablemente mayor, tanto para la venta interna como para la exportación, y la confirmación de su procedencia sólo puede ser respaldada por análisis que certifiquen la región de origen (Whisky Escocés, carne Argentina, vino Francés, etc.) (Wunderlin, 2005).

Por lo tanto, la habilidad de verificar el origen de un alimento es extremadamente valiosa para los consumidores y autoridades implicadas en el control. En la actualidad muchos de estos requisitos están asociados con un término anglosajón “*food traceability*”, que se ha castellanizado como **trazabilidad de los alimentos**. Este término se define como la capacidad de rastrear un alimento desde su origen hasta el consumidor (*from farm to fork*), dando lugar a una identificación fiable de sus ingredientes, un control sanitario y el seguimiento del alimento durante toda la cadena de producción y comercialización. La trazabilidad es, por lo tanto, una herramienta fundamental al servicio de la calidad alimentaria. Todos los alimentos serían susceptibles de ser sometidos a un proceso de trazabilidad mediante diversas acciones, medidas y procedimientos técnicos que contemplen la composición del alimento, su procesamiento tecnológico, fraccionamiento, etc.

1.1.1. Métodos analíticos para determinar el origen de los alimentos.

La información nutricional que se brinda regularmente en los envases de alimentos, rara vez incluye determinaciones que permitan verificar el concepto comercial de trazabilidad; de hecho, mucha de la información nutricional está basada en tablas de composición y no en análisis químicos de los alimentos. Sin embargo, el análisis moderno de alimentos plantea la necesidad de desarrollar y estandarizar métodos que garanticen la calidad, la autenticidad y la trazabilidad de materias primas y productos elaborados. Desde la perspectiva de la química de los alimentos, esto se busca a través del estudio de indicadores (marcadores) químicos propios de un dado producto, o indicadores de un dado proceso, como una evidencia objetiva y comprobable del origen y proceso de un alimento, tratando de establecer una especie de “**huella dactilar**” (*fingerprint*) del mismo.

En los últimos años, numerosas estrategias analíticas han sido implementadas para la determinación de la trazabilidad química en alimentos, entre ellas se encuentran el análisis del contenido en metales y metaloides, el análisis de isótopos estables, el estudio de compuestos orgánicos (volátiles y no volátiles), el análisis genético, o la combinación de varias de estas técnicas (*profiling*). Para la obtención de toda esta información sobre la composición química, se ha recurrido al uso de herramientas tales como técnicas de separación (HPLC, GC, CE), técnicas espectroscópicas (NMR, IR, SIRMS, ICP-MS,) y combinaciones de ambas (GC-MS, HPLC-MS, GC-TC/EA-IRMS, PTR-MS) así como el análisis sensorial (<http://www.trace.eu.org/je/spain/index.php>).

Nuestro grupo de trabajo ha logrado avanzar sobre la trazabilidad química de alimentos de interés económico de nuestro país, como son la miel, vinos y aceite de oliva. En mieles de diferentes regiones fitogeográficas del país se evaluó el perfil de aminoácidos, el cual mostró una estrecha relación con la flora apícola de las zonas estudiadas (Cometto *et al.*, 2006; Cometto *et al.*, 2003). Por otra parte, a través del análisis de parámetros químicos tradicionales, sumados al perfil de minerales y compuestos volátiles se logró certificar el origen botánico y geográfico de la miel (Baroni *et al.*, 2006; Baroni *et al.*, 2009). Estos trabajos lograron demostrar que es factible evaluar la procedencia geográfica de miel a partir del estudio de su perfil químico, tanto en la parte inorgánica que se puede asociar al suelo de las regiones de origen, como en la composición de aminoácidos que podría asociarse con la flora dominante en una dada región geográfica.

Además, por medio del estudio de proteínas polínicas en la miel se logró desarrollar un enzoinmunoensayo para determinar el origen floral de este producto (Baroni *et al.*, 2004; Baroni *et al.*, 2002). Estos trabajos permitieron avanzar fuertemente en el desarrollo de métodos alternativos a la melisopalinología (estudio del polen) para determinar el origen floral de miel. Estos estudios también permitieron sentar las bases para el estudio de proteínas en alimentos, no solo desde el punto de vista nutricional o funcional, sino desde una perspectiva de trazabilidad química y evaluación de origen de productos alimenticios.

De la misma manera, a través del análisis multi-elemental (metales, metaloides, no metales) y/o compuestos polifenólicos, fue posible caracterizar y clasificar vinos de tres regiones vitivinícolas del país, contribuyendo de esta manera a la trazabilidad del producto (Arrúa *et al.*, 2006; Di Paola-Naranjo *et al.*, 2011; Fabani *et al.*, 2010). Asimismo, mediante el análisis multi-elemental por ICP/MS y el análisis de relación de isótopos estables (IRMS), se logró diferenciar muestras de carne provenientes de tres provincias diferentes del país, asociando los contenidos de los elementos/isótopos estudiados con los correspondientes al suelo y agua de las mismas regiones de procedencia de la carne (Baroni *et al.*, 2011).

En este contexto, este trabajo de tesis busca estudiar el perfil multi-elemental e isotópico en alimentos de gran relevancia socio-económica en Argentina, como es el trigo, como una herramienta que contribuya a determinar su calidad y autenticidad.

1.1.1.1. Composición multi-elemental.

El estudio de la composición multi-elemental puede ser un buen indicador del origen geográfico de un alimento. Se conoce que la composición elemental (metales, metaloides y no metales, incluyendo elementos traza) de un alimento es el reflejo del tipo de suelo y de las condiciones ambientales (temperatura, lluvias, irradiación solar, etc.) donde dicho alimento se ha desarrollado (Kelly & Heaton, 2005). Dos suelos provenientes de regiones geológicas y geográficamente diferentes tienen distinta composición multi-elemental; por lo tanto, el mismo alimento producido en esas dos regiones también será diferente en su composición multi-elemental (Fabani *et al.*, 2010). Esta diferencia es el resultado de la capacidad que tienen los tejidos vegetales de tomar los nutrientes biodisponibles que se encuentran en el suelo donde fueron cultivados. Un ejemplo de esto lo brindan los metales alcalinos, especialmente el Rb y el Cs, los cuales son fácilmente movilizados en el suelo y fácilmente transportados a las plantas (Kelly & Heaton, 2005). La disponibilidad de elementos traza está regida por las condiciones del suelo como el pH, la humedad, la porosidad y su composición (arcilla, humus, etc.), por lo que el tipo de suelo, junto con la biodisponibilidad promedio de elementos presentes, proveen marcadores únicos en los alimentos para caracterizar su origen geográfico (Kelly & Heaton, 2005; K. W. Kim & Thornton, 1993).

Entre las herramientas más utilizadas para la determinación de multi-elementos en muestras de distinto tipo, se destaca el espectrómetro de masas con plasma de acoplamiento inductivo (**ICP-MS**).

1.1.1.2. *Análisis isotópico.*

El análisis de la variación isotópica también es una herramienta útil para determinar la autenticidad de los alimentos, ya que brinda información sobre el origen geográfico y botánico de un alimento.

La mayoría de los elementos tienen dos o más isótopos. Por ejemplo el azufre está constituido por dos isótopos con abundancias relativas (ar) diferentes: el ^{32}S (ar = 95,02 %), y el ^{34}S (ar = 4,21 %). Generalmente la abundancia isotópica de un elemento en la naturaleza se mantiene aproximadamente constante. Sin embargo, existen fenómenos que producen pequeñas variaciones (fraccionamiento isotópico) en la composición isotópica de un elemento. Dicho fraccionamiento isotópico se da cuando un elemento pasa de una matriz a otra (por ejemplo desde el agua a un vegetal o animal). En otros casos, la abundancia isotópica cambia como función de la edad geológica de un suelo (^{87}Sr por ejemplo). En otras ocasiones, distintos ciclos bioquímicos ocasionan fraccionamiento (^{13}C en la fotosíntesis por ejemplo) (Faure & Mensing, 2005).

Todos estos aspectos hacen que la composición de isótopos estables de un alimento sea una fuente de información muy importante para determinar el origen de un alimento, entre otras determinaciones analíticas.

Entre los fenómenos que pueden provocar cambios en las relaciones isotópicas de un elemento podemos mencionar:

- Reacciones químicas entre compuestos donde están involucrados estos elementos;
- Cambios en el estado de agregación (evaporación y condensación, cristalización y fusión);
- El decaimiento espontáneo de un átomo de un elemento para formar un nuevo átomo más estable de otro elemento (este fenómeno permite diferenciar por ejemplo suelos de distintas edades geológicas).

Las reacciones químicas como así también los cambios en el estado de agregación provocan enriquecimiento o reducción de alguno de los isótopos de un elemento (fraccionamiento isotópico), dando información sobre los cambios climáticos (humedad, temperatura, precipitaciones, entre otros) y biológicos que sufre por ejemplo un alimento. Estos fenómenos se observan en elementos livianos como H, C, N, O y S. Por otro lado, los isótopos “*hijos*” generados de un decaimiento radioactivo de un isótopo “*padre*” se acumulan en rocas y minerales, y esta combinación entre padre e hijo provee información de la edad geológica del suelo. Esto se observa por ejemplo, en el decaimiento radiactivo del ^{87}Rb para generar el ^{87}Sr , modificando la relación $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ naturalmente presente en el mar (Faure & Mensing, 2005).

↪ Isótopos estables.

Los isótopos estables han demostrado ser una herramienta importante para determinar el origen de los alimentos.

Estos se expresan en la notación internacional delta (δ) en partes por mil (‰) con respecto a estándares internacionales. Los valores delta se calculan con la **Fórmula 1.1.**

Fórmula 1.1.

$$\delta (\text{‰}) = \frac{(R_{\text{muestra}} - R_{\text{estándar}})}{R_{\text{estándar}}} \times 1000$$

Donde R_{muestra} es la relación isotópica (ej. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ o $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) de la muestra y $R_{\text{estándar}}$ es la relación isotópica del material usado como patrón.

La evaluación de la relación de isótopos estables por espectrometría de masas de isótopos estables o cociente isotópico (IRMS), o por NMR ha brindado elementos fundamentales a la hora de evaluar procedencia geográfica o botánica de alimentos, y también en la evaluación de adulteraciones de alimentos genuinos.

Relación isotópica del carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$).

El carbono en la naturaleza presenta tres isótopos (^{12}C , ^{13}C y ^{14}C). Los isótopos ^{12}C (ar = 98,9 %) y ^{13}C (ar = 1,1 %) son estables y pueden ser fraccionados por procesos químicos o biológicos, mientras que el isótopo ^{14}C es radioactivo.

Las plantas incorporan carbono (como CO_2) a través de la fotosíntesis, la cual convierte H_2O y CO_2 atmosférico en materia orgánica. En este proceso se produce un fraccionamiento isotópico del carbono, debido a que las plantas prefieren usar ^{12}C por sobre ^{13}C en el proceso fotosintético, lo que genera un valor negativo en la relación de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ con relación al CO_2 atmosférico. Esto se verá expresado también en el valor $\delta^{13}\text{C}$, ya que la materia orgánica de las plantas presenta una disminución de ^{13}C con respecto al estándar utilizado para determinar la relación isotópica de carbono (O'Leary, 1981).

Sin embargo, no todas las plantas producen el mismo fraccionamiento del carbono. Dependiendo del ciclo fotosintético de una planta, se pueden obtener distintos valores de $\delta^{13}\text{C}$. En plantas del tipo C_3 (trigo, cebada, papa etc.), donde el CO_2 se metaboliza a través del ciclo fotosintético de Calvin, el $\delta^{13}\text{C}$ varía de -22 a -33‰, con una media de -25‰, mientras que en plantas que siguen el ciclo fotoquímico de Hatch-Slack, como las C_4 (caña de azúcar, maíz, avena, etc.), los valores de $\delta^{13}\text{C}$ varían de -10 a -20‰, con una media de -12‰, ya que fijan más cantidad de ^{13}C que las plantas C_3 (Bullen & Kendall, 1998).

Debido a que las plantas C_3 predominan a latitudes altas y climas fríos, y las plantas C_4 son más comunes en climas cálidos a menores latitudes, hay un gradiente de decrecimiento de $\delta^{13}C$ desde el ecuador a los polos, por lo que se puede utilizar este parámetro como una aproximación a la determinación del origen geográfico de los alimentos, además de permitir distinguir el origen botánico de un alimento. Por otro lado, mayores temperaturas, estrés hídrico y otros factores ambientales producen ligeros cambios en la proporción de ^{13}C , aún en plantas del mismo ciclo fotosintético, permitiendo agregar un cierto nivel de discriminación geográfico al origen de plantas con un mismo tipo de fotosíntesis (Farquhar *et al.*, 2003; O'Leary, 1995).

Relación isotópica del nitrógeno ($^{15}N/^{14}N$).

El nitrógeno existe en la naturaleza como ^{14}N (ar = 99,63 %) y ^{15}N (ar = 0,37 %). Tanto el ^{14}N como el ^{15}N son isótopos estables y el cambio en la relación $^{15}N/^{14}N$ (expresado como $\delta^{15}N$, usando el nitrógeno atmosférico como estándar) puede ser utilizado como marcador químico de alimentos de origen vegetal ya que provee información sobre las prácticas agrícolas regionales, como ser el uso de fertilizantes nitrogenados, abono orgánico, etc. (Fraser *et al.*, 2011).

Las plantas toman el nitrógeno necesario para su funcionamiento (en forma de NO_3^- y NH_4^+) del suelo donde nacen y se desarrollan, por lo que el valor de $\delta^{15}N$ encontrado en ellas reflejará el $\delta^{15}N$ del suelo y esto puede ser utilizado para trazar el origen de los alimentos. Sin embargo, el nitrógeno en el suelo puede provenir de distintas fuentes. Una fuente es a través del nitrógeno atmosférico (N_2), el cual es fijado a través de bacterias que lo convierten en NH_4^+ . Otra fuente es el uso de fertilizantes químicos utilizados para la producción agrícola (“*abono sintético*”) en forma de NO_3^- y NH_4^+ . También el uso de desechos animales (“*abono orgánico*”) es una fuente importante de nitrógeno en el suelo y por último otro aporte de nitrógeno proveniente de las rocas y minerales, aunque usualmente esta fuente es considerada como insignificante (Evans, 2001). Estas distintas fuentes de nitrógeno tienen distintos valores de $\delta^{15}N$, el nitrógeno atmosférico tiene un valor de $\delta^{15}N$ igual a 0‰, mientras que los fertilizantes químicos presentan valores de $\delta^{15}N$ comprendidos entre 0‰ y 3‰. Por otro lado los valores de $\delta^{15}N$ de los desechos animales oscilan entre 10‰ y 25‰. Esta variación en los valores de $\delta^{15}N$ se traslada a las plantas.

Generalmente la aplicación prolongada de abono animal, el cual está relativamente enriquecido en ^{15}N , hace que las plantas y el suelo tengan valores de $\delta^{15}N$ más altos, mientras que la utilización de fertilizantes químicos los disminuye (Cai *et al.*, 2002; Piasentier *et al.*, 2003).

Es importante resaltar que los valores de $\delta^{15}N$ también pueden estar influenciados por las precipitaciones, la temperatura ambiente, la salinidad y la historia del cultivo (Bateman *et al.*, 2005).

↳ Isótopos del estroncio (Sr).

El Sr en la naturaleza presenta cuatro isótopos estables: ^{88}Sr (ar = 82,53), ^{87}Sr (ar = 7,04), ^{86}Sr (ar = 9,87) y ^{84}Sr (ar = 0,56). Los isótopos ^{88}Sr , ^{86}Sr y ^{84}Sr están en proporciones relativas constantes, mientras que ^{87}Sr aumenta debido al decaimiento radiactivo β de ^{87}Rb (vida media de 48,8 billones de años) (García-Ruiz *et al.*, 2007).

El Rb es un elemento disperso que se encuentra en minerales que contienen K. Por sí sólo no puede formar minerales, pero puede sustituir al K de estos, ya que el radio iónico del Rb^+ (1,48 Å) es similar al del K^+ (1,33 Å) (Faure & Mensing, 2005). Lo mismo ocurre con Sr y Ca, el radio iónico del Sr^{2+} (1,13 Å) es similar al radio del Ca^{2+} (0,99 Å) y lo puede reemplazar en minerales que contiene Ca. Además el Sr^{2+} también puede reemplazar al K^+ .

Debido a que el Sr varía su relación isotópica por el decaimiento de ^{87}Rb y que, además, ambos elementos se encuentran en rocas y minerales, cuya proporción de ^{87}Sr va aumentando con el tiempo por el decaimiento antes mencionado de ^{87}Rb , el estudio de la variación del ^{87}Sr puede ser utilizado para determinar la edad geológica del suelo, y por lo tanto determinar el origen geográfico/geológico de los alimentos (Voerkelius *et al.*, 2010).

La variación isotópica del ^{87}Sr se mide como la relación entre $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, ya que el ^{86}Sr permanece constante en rocas y minerales. Entonces, la relación $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ en una roca o mineral dependerá de la relación $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ inicial, de la relación $^{87}\text{Rb}/^{86}\text{Sr}$ y de la edad de esa roca o mineral (Faure & Mensing, 2005). Las rocas basálticas presentan el valor más bajo de $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ (0,702-0,706), mientras que el granito muestra el valor más alto (0,710-0,750). La piedra caliza tiene valores intermedio de la relación isotópica $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ (0,706-0,709).

Los valores de abundancia relativa de los isótopos del Sr en las rocas se transfieren al suelo a través de la erosión (factores climáticos, el terreno, la litología), y a continuación a las plantas.

Los procesos biológicos que tienen lugar en las plantas no fraccionan significativamente los isótopos del estroncio (Stewart *et al.*, 1998), por lo que la relación $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ de las plantas está estrechamente relacionada con la relación $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ del suelo (Dambrine *et al.*, 1997; Yokoo & Nakano, 1996), lo que puede utilizarse para determinar el origen geográfico de los alimentos.

En los últimos años, numerosos trabajos han reportado que la combinación del perfil elemental sumado a la relación de isótopos estables de un alimento puede ser utilizada para la designación de origen (Baroni *et al.*, 2011; Camin *et al.*, 2010; Camin *et al.*, 2010; Di Paola-Naranjo *et al.*, 2011; Pilgrim *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2008). Sin embargo, muy pocos estudios de este tipo se han llevado a cabo para determinar la procedencia de muestras de trigo (Branch *et al.*, 2003; Goitom Asfaha *et al.*, 2011).

Brescia *et al.* en el año 2002 lograron diferenciar muestras de sémola de *triticum durum* de Italia y otros países (Canadá, Turquía y Australia) evaluando los patrones


isotópicos ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{18}\text{O}$). De esta forma pudieron demostrar una relación entre el contenido isotópico y la latitud. Por otro lado, Branch *et al.* (2003) realizaron una investigación preliminar, usando isótopos estables y análisis elemental ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, Cd, Pb, Se y Sr), para identificar el país de origen de muestras comerciales de trigo en Estados Unidos, Canadá, Francia y Alemania aplicando análisis discriminante. Ellos encontraron que las muestras de trigo podían ser clasificadas geográficamente utilizando solo una relación isotópica ($\delta^{13}\text{C}$).

Adicionalmente, la combinación de la firma isotópica del estroncio ($^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$), sumado a la relación isotópica de elementos livianos ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^{34}\text{S}$) y al perfil multi-elemental, le permitieron a Goitom Asfaha *et al.* (2011) discriminar diferentes muestras de cereales europeos de acuerdo a la latitud del sitio de muestreo/área de producción, la proximidad al mar y la geología del suelo. También Zhao *et al.* (2011) presentaron un método estadístico multivariado para determinar el origen geográfico del trigo de 4 regiones de mayor producción en China, teniendo en cuenta diferentes variedades y años de producción. El método permitió clasificar al trigo de acuerdo a sus regiones geográficas de crecimiento usando análisis multi-elemental (Be, Na, Mg, Al, K, Ca, V, Mn, Fe, Cu, Zn, Mo, Cd, Ba, y Th). Ellos también encontraron que la composición elemental puede estar influenciada por las variedades del cereal, años de cultivo y prácticas agroquímicas.

Estos resultados sugieren que la discriminación de muestras de trigo de acuerdo al origen geográfico es posible, utilizando como herramienta para la extracción de datos la estadística multivariada, también conocida como quimiometría (*chemometrics*) (**Anexo I**). Sin embargo son pocos los estudios que relacionan el contenido de isótopos y de elementos de los alimentos de origen vegetal con el suelo donde se cultivan y el agua con que se irrigan. Adicionalmente, no se han encontrado trabajos de este tipo en trigo, lo que permitiría una caracterización de procedencia mucho más certera a través de la asociación entre suelo, agua y trigo.

Es por esto que se planteó el estudio tendiente a la obtención de una huella dactilar propia para trigos argentinos, considerando tanto la composición multi-elemental como el patrón isotópico de trigo procedente de tres regiones diferentes (Buenos Aires, Córdoba y Entre Ríos). Adicionalmente, se buscó demostrar la correlación entre trigos, suelo y agua aplicando diferentes herramientas quimiométricas. Lo que diferencia a este estudio de otros similares en el área, es que no sólo se investiga el producto alimenticio, sino que también se busca entender y modelar la relación del alimento con el agua y el suelo local, para poder predecir científicamente la composición de los alimentos a través de los parámetros del agua y del suelo donde fueron producidos.

1.2. MATERIALES Y MÉTODOS.

El estudio de la Trazabilidad Química en trigos argentinos se enmarcó dentro del proyecto , el cual fue fundado en el año 2004 por la comisión Europea con el objetivo de desarrollar métodos que permitieran “trazar” (rastrear) el origen de los alimentos de la granja al consumidor (“*from farm to fork*”). Este proyecto buscaba establecer una relación entre la composición de varios productos alimenticios típicos de Europa (agua mineral, trigo o cebada, aceitunas, aceite de oliva, miel, cordero, carne vacuna y aves de corral), y las características geológicas y climatológicas de sus áreas de producción, a través del estudio de la composición y características de estos alimentos procedentes de toda Europa y de algunos países extra-comunitarios (Argentina y China entre ellos). La relación geoquímica entre geología/clima y los productos alimenticios podría ser utilizada para predecir la composición de alimentos europeos como así también proveer una forma fácil, accesible y rentable de verificar la autenticidad de estos o detectar fraudes de procedencia en el caso de países extra-comunitarios.

En el año 2007 ingresa al proyecto TRACE nuestro país, con el objetivo de estudiar la trazabilidad y la autenticidad de alimentos argentinos altamente valorados en el extranjero (carne vacuna, trigo, miel, aceite de oliva y vino). La Universidad Nacional de La Plata y CONICET (IGEVET, Instituto de Genética y Veterinaria), el Instituto de Geocronología y Geología Isotópica (INGEIS-CONICET-UBA), y la Universidad Nacional de Córdoba, fueron las instituciones encargadas de llevar adelante el muestreo, las determinaciones, los análisis y las publicaciones de todos los resultados obtenidos.

En esta tesis sólo fueron plasmados los resultados obtenidos para trigo, pero para el resto de los alimentos se pueden consultar las siguientes publicaciones: Di Paola-Naranjo *et al.*, 2011; Baroni *et al.*, 2011 y Baroni *et al.*, 2015.

1.2.1. Estándares y Reactivos.

La solución estándar multi-elemental CertiPUR Merck VI de grado ICP-MS fue obtenida de Merck-Química Argentina (Buenos Aires, Argentina). El material certificado de referencia (MCR) de harina de trigo 1567a fue obtenido del National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, MD, Estados Unidos). Los valores estimados de los elementos en el MCR 1567a se detallan en el certificado de análisis provisto por el fabricante. La resina Sr Spec[®] de intercambio iónico fue obtenida de Eichrom Technologies (Estados Unidos). El estándar isotópico de estroncio (NBS SRM 987) fue empleado para determinar la discriminación de masa durante el análisis isotópico por espectrometría de masas de ionización térmica (TIMS). El ácido nítrico (63,7%) de grado ultrapuro (*sub-boiling*) fue preparado a partir de ácido de grado analítico utilizando un destilador Figmay (Córdoba,

Argentina). La pureza del ácido nítrico (HNO_3) fue verificada por ICP-MS. Los filtros (0,45 μm , HAWG04756) fueron obtenidos de Millipore (São Paulo, Brasil). El agua ultrapura (<5 $\mu\text{g/L}$ TOC) fue obtenida de un sistema de purificación Arium 61316-RO combinado con un Arium 611 UV (Sartorius, Alemania). El resto de los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

1.2.2. Muestreo.

Las muestras de trigo, suelo y agua se tomaron en tres provincias Argentinas: **Buenos Aires, Córdoba y Entre Ríos**, las cuales representan el área más importante de producción de trigo en Argentina (**Figura 1.1**). Las muestras de suelo y agua se recolectaron para relacionar la composición del trigo con la geología y el clima de las áreas de producción, ya que éstas reflejan mejor tanto la firma geoquímica de los alimentos (a través de la captación), así como la geología local (elementos traza / isótopos estables) y el clima (isótopos estables).

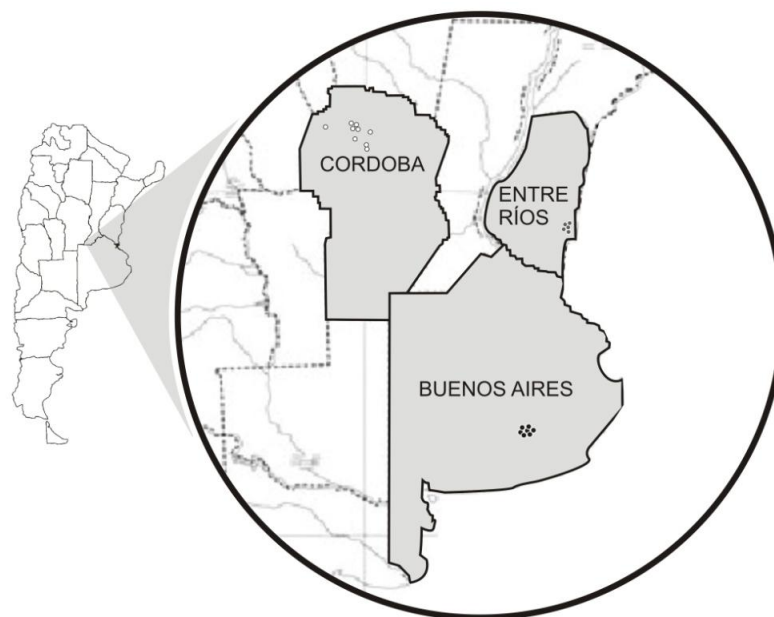


Figura 1.1. Mapa de las regiones donde fueron recolectadas las muestras de trigo: (círculos blancos) granjas localizadas en Córdoba; (círculos gris) granjas localizadas en Entre Ríos; (círculos negros) granjas localizadas en Buenos Aires.

El área de muestreo en Buenos Aires se localizó entre $37^{\circ}25'$ y $37^{\circ}38'$ de latitud Sur y entre $59^{\circ}10'$ y $59^{\circ}14'$ de longitud Oeste; el área de muestreo en Córdoba estuvo comprendida entre $30^{\circ}30'$ y $31^{\circ}08'$ de latitud Sur y $63^{\circ}34'$ y $64^{\circ}08'$ de longitud Oeste;

mientras que en Entre Ríos el área de muestreo se localizó entre 32°49' y 32°53' de latitud Sur y 58°32' y 58°34' de longitud Oeste. La altitud varió de 460 metros sobre el nivel del mar en Córdoba, a 240 metros sobre el nivel del mar en Buenos Aires, y a 30 metros en Entre Ríos.

La provincia de Buenos Aires y Entre Ríos se caracterizan por un clima templado pampeano húmedo, con precipitaciones anuales de 1100 mm y 1000 mm, respectivamente, y temperaturas anuales promedio de 16,6°C y 14,5°C, respectivamente, mientras que la provincia de Córdoba presenta un clima templado serrano con precipitaciones anuales de 800 mm y temperaturas anuales promedio de 17°C.

El muestreo fue realizado durante 3 años (2007, 2008 y 2009) en diferentes granjas: 7 granjas en Buenos Aires, 9 en Córdoba, y 5 en Entre Ríos.

1.2.2.1. Trigo.

Se recolectaron 80 muestras de trigo: 27 en Buenos Aires, 26 en Córdoba y 27 en Entre Ríos. Un kilogramo de grano fresco fue separado de la paja y recolectado en una bolsa plástica. Luego fueron transportados al laboratorio, secados a 40°C durante 4 días, y almacenados a 4-8°C hasta el análisis. Inmediatamente antes del análisis, las muestras se limpiaron, trituraron y homogeneizaron, seguido de secado a 40°C toda la noche.

1.2.2.2. Suelo.

En total se recolectaron 130 muestras de suelo: 44 en Buenos Aires, 44 en Córdoba y 42 en Entre Ríos. La recolección se realizó con pala de acero inoxidable a 10-20 cm de profundidad, descartando la capa superior que contiene vegetación y está más expuesta a la contaminación ambiental y a los efectos de los fertilizantes (Almeida & Vasconcelos, 2003). Las muestras (1 kg) se secaron en estufa a 40°C durante 2 días, se molieron y se tamizaron en tamiz de malla plástica de 2 mm (para evitar contaminación con metales procedentes de los tamices metálicos tradicionales). El material tamizado se secó por otras 16 h y se almacenó en bolsas negras de plástico (oscuridad) hasta su análisis.

1.2.2.3. Agua.

Se recolectaron 120 muestras de agua, 40 en cada provincia. Estas se tomaron en pequeños arroyos/ríos/canales utilizados para riego dentro de la zona delimitada para el muestreo de trigo y suelo, y se almacenaron en botellas plásticas previamente lavadas con HNO₃ al 10% para transportarlas hasta el laboratorio.

1.2.3. Análisis Multi-elemental.

1.2.3.1. Preparación de las muestras.

↳ Mineralización de las muestras de trigo.

La mineralización es el proceso por el cual una muestra es sometida a altas temperaturas o a una digestión en presencia de ácidos fuertes, con el fin de destruir la materia orgánica presente en ella. En este trabajo las muestras de trigo fueron mineralizadas utilizando un horno microondas Anton Paar Multiwave 3000.

Quinientos miligramos de muestras seca de trigo se pesaron dentro un tubo de cuarzo de 80 mL de capacidad, y se agregaron 8 mL de HNO₃ concentrado. El tubo se mantuvo abierto hasta que no se observó desprendimiento de vapores de color marrón-amarillentos (NO₂). Luego se cerró y calentó siguiendo la secuencia: 15 minutos de rampa hasta llegar a una potencia de 400 W; 45 minutos a 400 W (máxima temperatura = 177°C; máxima presión = 75.7 bar); y 15 min a potencia 0 W para llegar a presión constante y a temperatura ambiente. La muestra mineralizada se transfirió cuantitativamente a un matraz de 25 mL, se enrasó con agua ultra pura y luego se filtró usando filtros de 0,45 µm.

Para verificar la eficiencia del método de mineralización el MCR de harina de trigo 1567a fue procesado de la misma forma que las muestras de trigo. Se encontró que el método empleado permite recuperar entre el 85 % y el 107 % de todos los elementos certificados.

↳ Extracción de elementos biodisponibles en suelo.

Se entiende por elementos biodisponibles aquellos que estarían en directa disponibilidad para ser tomados por las raíces de las plantas. Esto depende de varios factores inherentes al suelo como pH, capacidad de intercambio catiónico, cantidad de materia orgánica, textura, entre otros.

En este trabajo, la fracción biodisponible de elementos en las muestras de suelo se obtuvo pesando 20 g de suelo tamizado seco dentro de un pote plástico de 250 mL de capacidad y agregando luego 50 mL de una solución 1 M de nitrato de amonio (NH₄NO₃). La extracción de los elementos biodisponibles se logró después de agitar la mezcla por 2 h en un homogeneizador orbital (VICKING, modelo KLINE) a temperatura ambiente. Posteriormente se dejó reposar el contenido del pote por 1 h, se filtró (filtro de 0,45 µm) la solución resultante y se acidificó con 0,5 mL de NHO₃ sub-boiling.

La eficiencia del método de extracción se verificó fortificando muestras de suelo con cantidades conocidas de estándares (1000 mg/L en HNO₃ al 1 %) de distintos elementos. La concentración empleada de cada uno de los elementos utilizados fue igual al doble de la concentración encontrada de ellos en las muestras de suelo sin fortificar. Estas muestras

fueron procesadas de la misma forma que las muestras sin fortificar y los resultados obtenidos mostraron recuperaciones comprendidas entre el 80 y el 120%.

↳ ***Preparación del las muestras de agua.***

Inmediatamente después de que las muestras de agua llegaron al laboratorio, se procedió con el filtrado de 250 mL de estas a través de filtros de 0,45 μm y la posterior acidificación con 1 mL de HNO_3 ultrapuro. Las muestras se almacenaron a 4-8°C hasta su análisis.

1.2.3.2. Determinación.

Treinta y un elementos fueron cuantificados en las muestras de trigo, suelo y agua: Al, B, Ba, Ca, Cd, Ce, Co, Cs, Cu, Eu, Ga, K, La, Li, Lu, Mg, Mn, Mo, Na, Nd, Ni, Pb, Rb, Se, Sm, Sr, Tl, U, V, Yb, y Zn.

El análisis de Na se llevó a cabo en un espectrofotómetro de absorción atómica de llama (FAAS por sus siglas en inglés) Perkin-Elmer Modelo 3110, con una llama de aire-acetileno y utilizando KCl como modificador de matriz. Antes de la medición, las muestras de suelo debieron ser diluidas 20 veces, mientras que las de agua 100 veces y las de trigo no necesitaron dilución.

El resto de los elementos se analizaron a través de un espectrómetro de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS por sus siglas en inglés) serie Thermo-Elemental X7 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania), equipado con un auto muestreador modelo ASX-100 (CETAC Technologies, Omaha, NE, Estados Unidos). El sistema de introducción de la muestra consistió en un nebulizador concéntrico de micro flujo, una cámara de pulverización enfriada con Peltier, y una antorcha fijada al inyector de 1.5 mm de diámetro interno. La potencia de radiofrecuencia fue de 1350 W para todos los experimentos, y la interfaz estaba equipada con un cono de muestreo de Ni y un cono espumante designado para una baja formación de poliátomos.

Se utilizaron 2 modos de operación: con y sin tecnología de celda de colisión (TCC). La medición con el modo TCC fue optimizada para Ba, Ca, Cd, Co, Cu, Ga, K, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, U, V, y Zn. La celda de colisión se lavó con 7% de H_2 en una mezcla de alta pureza de He. Los elementos Al, B, Ce, Cs, Eu, La, Li, Lu, Nd, Sm, Tl, y Yb se midieron sin celda de colisión, obteniéndose la máxima sensibilidad. La proporción de óxido y las especies de doble carga se mantuvieron por debajo del 1% para ambos modos de funcionamiento. Todas las mediciones del QICP-MS fueron optimizadas usando Sc, In, y Re como estándares internos. Antes de la medición, las muestras de trigo, suelo y agua fueron diluidas 10 veces usando una mezcla 1 % de HNO_3 y 0,5% de HCl. Los estándares y los blancos fueron preparados usando la misma mezcla (1% HNO_3 - 0,5% HCl).

Tanto en FAAS como en QICP-MS, los blancos instrumentales y de procesamiento fueron medidos juntos con las muestras, y se midieron al igual que estas por quintuplicado. Para cada elemento se realizó una curva de calibración para la cuantificación de las muestras. La precisión se estudió a través del coeficiente de variación (% CV), el cual fue inferior al 5% en todas las muestras.

1.2.4. Análisis de isótopos estables ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$).

1.2.4.1. Preparación de las muestras.

↪ Trigo.

El primer paso en la preparación de las muestras de trigo consistió en el desgrasado de las mismas. Esto se realizó utilizando un aparato Soxhlet con hexano durante 6 h. La muestra libre de grasa se secó en una campana de extracción durante toda una noche hasta peso constante y se almacenó en recipientes con tapa hasta la medición.

1.2.4.2. Determinación.

El suelo anteriormente tamizado (**Sección 1.2.2.2**) y el trigo desgrasado (5-8 mg) se pesaron en cápsulas de estaño para el análisis de N y C. La cápsula se cerró herméticamente y se dejó caer en el tubo de reacción de un analizador elemental Carlo Erba. La combustión se llevó a cabo a 1020 °C. Los productos se separaron por cromatografía gaseosa (CG) usando He como gas portador y, a través de una interfaz de ConFlo IV, fueron introducidos a un espectrómetro de masas de isótopos estables (Thermo Fisher Scientific DELTA V Plus).

Los valores isotópicos se expresaron en la notación internacional delta (δ) en partes por mil (‰) con respecto a estándares internacionales provistos por la Agencia Internacional de Energía Atómica (OIEA NBS 22 y N-1): $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativo a V-PDB (Vienna-Pee Dee Belemnite) y $\delta^{15}\text{N}$ (‰) relativo al aire atmosférico. Los valores delta se calcularon con la **Fórmula 1.1**. Las incertezas en las determinaciones fueron inferiores a 0,2‰ tanto en $\delta^{13}\text{C}$ como en $\delta^{15}\text{N}$. Los análisis fueron realizados en INGEIS (CONICET-UBA).

1.2.5. Análisis isotópico del estroncio.

La manipulación de las muestras se llevó a cabo en un entorno limpio (laboratorio de clase 100). Para evitar la contaminación, todo el material de laboratorio se empapó en HNO_3

al 50% (v/v) durante al menos 24 h, se enjuagó varias veces con agua ultra pura, y se secó en una campana de clase 100 de flujo laminar. La preparación de muestras en laboratorio limpio se realizó en INGEIS (CONICET-UBA), mientras que la medición de la relación isotópica se llevó a cabo en CONEA (Ezeiza, Buenos Aires) por TIMS.

1.2.5.1. Preparación de las muestras.

Trigo.

Las muestras de trigo fueron procesadas por la técnica de cenizas secas. Una alícuota de 5 g de muestra seca se colocó en crisoles de porcelana en una mufla a alta temperatura (550-600°C) durante 18 h hasta que se formó la ceniza. Después se dejó enfriar y los residuos se trataron con HNO₃ concentrado (2-4 mL). Posteriormente se evaporó el ácido en una plancha de calentamiento por 1 h y las muestras se transfirieron nuevamente a la mufla a 550-600 °C por otras 18 h. Las cenizas blancas obtenidas se disolvieron en HNO₃ 1 M el cual se evaporó hasta sequedad y se reservó para la separación del Sr con una resina de intercambio iónico.

Suelo.

Se tomaron 50 mL de la solución de elementos biodisponibles en suelos obtenida según se describe en la **Sección 1.2.3.1**, y se evaporaron hasta sequedad. El residuo obtenido se re-disolvió en HNO₃ 1M.

Agua.

Se tomaron 250-300 mL de agua y se evaporaron en un balón usando un manto calefactor con regulador de temperatura. Una vez que el volumen del balón se redujo a 10 mL aproximadamente, se transfirió la muestra a un vial de teflón Savillex® y se evaporó a sequedad debajo de una lámpara infrarroja (IR).

1.2.5.2. Separación cromatográfica del estroncio (Sr).

Para separar el Sr se utilizó la resina Sr Spec® (Eichrom Technologies, Estados Unidos). Las columnas fueron armadas con puntas plásticas de 5 mL. Se colocó un disco de material filtrante en el fondo de las mismas para retener la resina y luego se agregaron 100 mg de resina. Con algunos mililitros de HNO₃ 0,05 M se lavaron los restos de resina que quedaron pegados en las paredes de la columna. Se mezcló el ácido con la resina con un tubo capilar delgado para asegurarse de que no queden burbujas. Finalmente se colocó otro

filtro por encima del lecho de resina empujándolo firmemente hacia abajo con una varilla de vidrio y se lavó la columna con 2-3 mL de HNO₃ 0,05 M.

Las muestras de trigo, suelo y agua se reconstituyeron con 2 mL de HNO₃ 1 M y se sembraron en la columna previo acondicionamiento con 3 mL de HNO₃ 1 M. Una vez sembrada la muestra se lavó la columna con 3 mL de HNO₃ 8 M y se descartó la elución. Luego se agregaron 2 mL de HNO₃ 0,05 M y se recolectó para la determinación por espectrometría de masas de isótopos estables (IRMS).

1.2.5.3. *Determinación.*

Las relaciones isotópicas de Sr se midieron usando un espectrómetro de masas de ionización térmica (TIMS por sus siglas en inglés) Finnigan MAT-262 (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Alemania) acoplado a un auto muestreador de 13 muestras, usando 7 tazas de Faraday y un multiplicador de electrones secundarios como colectores. Las mediciones se llevaron a cabo utilizando una fuente de iones de renio de doble filamento. El NBS SRM 987 fue empleado como estándar para determinar el sesgo instrumental en cada conjunto de muestras y evaluar la reproducibilidad y la exactitud de las mediciones. El estándar Eimer & Amend (Massachusetts Institute of Technology)(Faures, 2001) también se analizó con regularidad para comprobar el correcto funcionamiento del espectrómetro de masas. Los coeficientes medidos se corrigieron para el fraccionamiento de masa usando $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr} = 8,375209$ (Steiger & Jäger, 1977). El ^{85}Rb fue monitoreado en cada bloque de datos para cuantificar cualquier interferencia de ^{87}Rb . Durante el curso de mediciones para este estudio, el SRM 987 mostró un valor de $0,71008 \pm 0,00026$ ($n = 50; \pm 1\sigma$).

1.2.6. *Tratamiento estadístico de los datos.*

Los programas utilizados para la interpretación de los resultados generados en esta parte de la tesis fueron: **STATISTICA** Versión 8.0 de StatSoft Inc. (2007) y el paquete **InfoStat** (Di Rienzo *et al.*, 2008). El fundamento de cada uno de los análisis estadísticos utilizados en este capítulo, y en los próximos, se encuentra en el **Anexo I**.

Para comparar las muestras de suelo, agua y trigo procedentes de distintas regiones argentinas se utilizó el análisis de la varianza usando modelos mixtos (Di Rienzo *et al.*, 2010), los cuales permiten contemplar heteroscedasticidad (**Anexo I, Sección 1.2**). El nivel de confianza p utilizado fue de 0,05 ($p < 0,05$) y el método de comparaciones múltiples fue DGR, propuesto por Di Rienzo *et al.* (2002), para comparar las medias de las muestras de a pares.

Para explorar los datos de trigo se utilizaron los análisis de conglomerado (AC, *cluster analysis*) y de componentes principales (ACP, *principal components-PCA*) (**Anexo I, Sección 1.3.1**). La matriz de datos se estandarizó a media 0 y varianza 1 para eliminar los

efectos de las diferencias de magnitud entre las variables. Para el AC se utilizó la distancia Gower ($\sqrt{1-S}$) como método para medir la proximidad entre los grupos (muestras) y el método de Ward como técnica de agrupamiento. Por otro lado el ACP se basó en la matriz de correlación, sin factor de rotación (opción sugerida para ACP) y valores promedio.

Para evaluar si las muestras de suelo, agua y trigo podían ser distinguidas matemáticamente según su origen geográfico se utilizó el análisis discriminante (AD). La selección de las variables más significativas se realizó por el análisis paso a paso (*stepwise discriminant analysis*) considerando el valor del estadístico F (**Anexo I, Sección 1.3.2**).

El análisis de procrustes generalizado (APG) (**Anexo I, Sección 1.3.1.4**) se utilizó para estudiar la relación entre los datos de trigo, suelo y agua. Para este análisis se utilizó el algoritmo Grower que minimiza la varianza dentro de las muestras mediante la aplicación de traducción, escalado y rotación para generar una configuración de promedios p dimensional Y_c . Después de esto, un espacio promedio del grupo q dimensional ($q \leq p$) se construye a partir Y_c por ACP. Por lo tanto, la teoría y algoritmos de APG se pueden aplicar para ver si coinciden los datos elementales e isotópicos de las muestras de trigo con los datos de suelo y agua correspondientes.

El análisis de correlación canónica (ACC) fue utilizado para estudiar la relación entre suelo y trigo, y entre agua y trigo, debido a que es un método estadístico matemático más robusto que el APG (**Anexo I, Sección 1.3.3.1**).

1.3. DESCRIPCIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

El análisis elemental de muestras de suelo, agua y trigo obtenidas de las distintas regiones estudiadas, incluyó 31 elementos de la tabla periódica: Al, B, Ba, Ca, Cd, Ce, Co, Cs, Cu, Eu, Ga, K, La, Li, Lu, Mg, Mn, Mo, Na, Nd, Ni, Pb, Rb, Se, Sm, Sr, Tl, U, V, Yb y Zn. Por otro lado, también se estudiaron dos isótopos estables, $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$, sólo en muestras de suelo y trigo, y la relación isotópica $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$.

Adicionalmente a la composición elemental e isotópica, se analizaron las relaciones K/Rb y Ca/Sr. La relación K/Rb puede diferir entre distintos suelos (Peltora *et al.*, 2008), mientras que la relación Ca/Sr ha sido utilizada como un marcador químico en geoquímica, hidrogeoquímica y estudios de biodisponibilidad (Land *et al.*, 2000; Pett-Ridge *et al.*, 2009).

1.3.1. Caracterización del área de muestreo.

La caracterización del área de muestreo donde se cultivan los trigos argentinos es necesaria para entender el perfil elemental e isotópico de estos, ya que estas áreas presentan diferencias climáticas y geológicas, por lo que se esperan diferencias tanto el perfil multi-elemental como en el patrón isotópico en muestras de suelo y agua provenientes de distintas regiones.

1.3.1.1. Análisis de la composición del suelo.

En la **Tabla 1.1** se resumen los resultados obtenidos de las distintas muestras de suelo recolectadas en las distintas regiones de muestreo de trigo.

De los 31 elementos analizados en todas las muestras de suelo estudiadas, Ba y Ca fueron los mayoritarios, seguidos por Sr, K y Mg. Ga, Se y V mostraron valores por debajo del límite de detección (LD) mientras que Cd, Lu, Mo, Ni y Pb presentaron valores por debajo del límite de cuantificación (LC). El resto de los elementos estudiados mostraron diferencias significativas entre suelos provenientes de distintas regiones geográficas.

Ba, Ca, Eu, Mn, Zn y Tl presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las 3 provincias analizadas, siendo los valores de Ba, Ca, Eu, Mn y Zn más altos en las muestras de suelos provenientes de Entre Ríos y más bajos en las muestras provenientes de Córdoba. Estos elementos en suelos de la provincia de Buenos Aires mostraron valores intermedios entre los encontrados en Entre Ríos y Córdoba. Tl también mostró valores más bajos en suelos provenientes de la provincia de Córdoba, pero los suelos de Buenos Aires presentaron los valores más altos, seguidos por los de Entre Ríos.

Tabla 1.1. Promedio y desviación estándar de los elementos medidos ($\mu\text{g}/\text{kg}$) y las relaciones isotópicas (unidad δ , ‰ por mil) correspondientes a las muestras de suelo analizadas en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Entre Ríos.

Variable	Buenos Aires	Córdoba	Entre Ríos
Al	120 ± 100 a	70 ± 80 b	90 ± 90 b
B	350 ± 200 a	270 ± 200 a	140 ± 60 b
Ba	(44 ± 8) x 10 ³ b	(23 ± 8) x 10 ³ c	(80 ± 50) x 10 ³ a
Ca	(27 ± 4) x 10 ⁵ b	(20 ± 4) x 10 ⁵ c	(36 ± 22) x 10 ⁵ a
Cd	10 ± 30 a	<LC	<LC
Ce	1,4 ± 0,8 b	1,4 ± 1,7 b	5 ± 5 a
Co	4 ± 3 b	3 ± 6 b	9 ± 8 a
Cs	40 ± 11 b	34 ± 17 b	51 ± 25 a
Cu	18 ± 16 b	40 ± 50 a	25 ± 11 a
Eu	4,6 ± 0,8 b	2,3 ± 1,0 c	10 ± 5 a
Ga	<LD	<LD	<LD
K	(9 ± 3) x 10 ⁵ a	(10 ± 13) x 10 ⁵ a	(3,7 ± 2,2) x 10 ⁵ b
La	5 ± 7 b	30 ± 120 a	10 ± 50 a
Li	200 ± 60 b	200 ± 90 b	230 ± 120 a
Lu	<LC	<LC	0,037 ± 0,015 a
Mg	(59 ± 15) x 10 ⁴ a	(52 ± 11) x 10 ⁴ b	(63 ± 10) x 10 ⁴ a
Mn	3400 ± 2300 b	1000 ± 4000 c	8000 ± 7000 a
Mo	<LC	10 ± 80 a	<LC
Na	30 ± 50 b	50 ± 100 a	60 ± 120 a
Nd	1,3 ± 0,6 b	1,1 ± 1,4 b	2,6 ± 2,5 a
Ni	<LC	<LC	40 ± 30 a
Pb	<LD	<LC	<LC
Rb	1400 ± 300 a	1000 ± 500 b	1500 ± 400 a
Se	<LD	<LD	<LD
Sm	0,34 ± 0,11 b	0,3 ± 0,3 b	0,7 ± 0,4 a
Sr	(18 ± 5) x 10 ³ b	(18 ± 9) x 10 ³ b	(34 ± 19) x 10 ³ a
Tl	12 ± 4 a	5 ± 3 c	9 ± 3 b
U	4 ± 5 a	1 ± 3 b	0,5 ± 0,9 b
V	<LD	<LD	<LD
Yb	0,11 ± 0,04 b	0,09 ± 0,08 b	0,16 ± 0,09 a
Zn	60 ± 30 b	31 ± 23 c	90 ± 50 a
Ca/Sr	150 ± 50 a	130 ± 40 b	100 ± 40 c
K/Rb	700 ± 300 b	1000 ± 600 a	300 ± 300 c
d¹³C	-23,9 ± 1,1 b	-19,4 ± 1,9 a	-19,7 ± 1,6 a
d¹⁵N	7,7 ± 0,9 b	6,9 ± 1,3 c	8,9 ± 1,3 a
⁸⁷Sr/⁸⁶Sr	0,7067 ± 0,0005 c	0,7102 ± 0,0030 a	0,7075 ± 0,0002 b

<LD significa menor al límite de detección y <LC menor al límite de cuantificación. LD instrumental ($\mu\text{g}/\text{kg}$): Ga (1,7), Pb (0,25), Se (7,5) y V (25,0). LC instrumental ($\mu\text{g}/\text{kg}$): Cd (1,7), Lu (0,033), Mo (1,7), Ni (20,8) y Pb (0,83).

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Por otro lado B, Ce, Co, Cs, K, Li, Nd, Sm, Sr e Yb fueron similares en suelos procedentes de Córdoba y Buenos Aires, pero los suelos de Entre Ríos presentaron los valores más altos de Ce, Co, Cs, Li, Nd, Sm, Sr y Yb, y los más bajos de B y K. Adicionalmente, Al, Cu, La, Na y U presentaron valores similares en suelos de Entre Ríos y Córdoba, pero en Buenos Aires mostraron los valores más bajos de Cu, La y Na, y los valores más altos de Al y U.

Mg y Rb no diferenciaron suelos de Entre Ríos y Buenos Aires, pero estos elementos presentaron valores significativamente menores en suelos procedentes de la provincia de Córdoba.

También se encontraron variaciones en las relaciones de Ca/Sr y K/Rb. La relación Ca/Sr fue mayor en muestras provenientes de Buenos Aires, intermedia en aquellas provenientes de Córdoba, y más baja en muestras de Entre Ríos, mientras que K/Rb fue menor en suelos de Entre Ríos, intermedia en suelos de Buenos Aires, y más alta en aquellos procedentes de Córdoba.

El análisis isotópico de las muestras de suelo también manifestó diferencias significativas entre distintas regiones. $\delta^{15}\text{N}$ fue significativamente mayor en muestras de Entre Ríos, seguidas por las muestras de Buenos Aires y luego Córdoba, mientras que $\delta^{13}\text{C}$ presentó valores similares en muestras de Entre Ríos y Córdoba pero menores en Buenos Aires. Por otro lado la relación isotópica $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ fue superior en suelos procedentes de Córdoba, e inferior en muestras provenientes de Buenos Aires. Los suelos de Entre Ríos mostraron valores intermedios de $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$.

Las variables analizadas demuestran que existen diferencias entre suelos provenientes de distintas regiones geográficas. Para verificar si estas diferencias pueden distinguir una muestra proveniente de una dada región, se recurrió a la estadística multivariada, la cual permite analizar simultáneamente todas las variables para el conjunto de muestras analizadas, procedentes de los tres sitios de muestreo.

Las variables se estudiaron a través del análisis discriminante paso a paso (ADS). Se eligió la metodología paso a paso hacia adelante (*forward stepwise*) (F para aceptar = 4; Tolerancia = 0,01; N° de etapas = 30). De las 28 variables utilizadas para este análisis (Al, B, Ba, Ca, Ce, Co, Cs, Cu, Eu, K, La, Li, Mg, Mn, Na, Nd, Rb, Sm, Sr, Tl, U, Yb, Zn, Ca/Sr, K/Rb, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ y $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$), sólo 14 fueron necesarias para discriminar el 100 % de las muestras de suelo analizadas: $\delta^{13}\text{C}$, Eu, Ba, Tl, Mn, $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, Ca/Sr, $\delta^{15}\text{N}$, U, Cu, Na, Al, Zn y Ce. De estas, Ba, Eu, Mn, Zn, Tl, Ca/Sr, $\delta^{15}\text{N}$ y $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ son capaces de diferenciar las tres áreas de estudio, mientras que Ce y Cu permiten diferenciar las muestras de Entre Ríos y Na y $\delta^{13}\text{C}$ las muestras de Buenos Aires (**Tabla 1.1**). En la **Figura 1.2** se muestra el diagrama de dispersión generado a partir de este análisis.

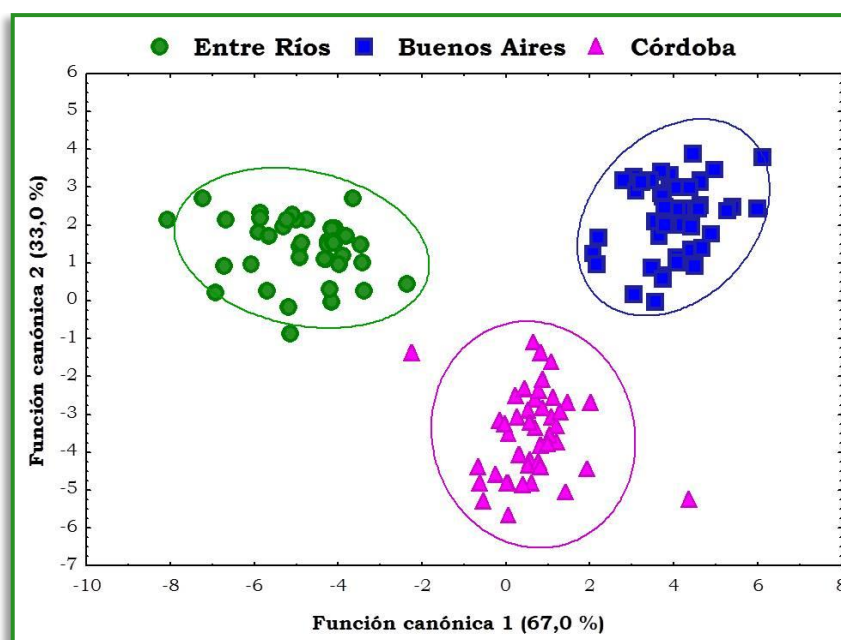


Figura 1.2. Diagrama de dispersión de dos funciones discriminantes canónicas, las cuales muestran la separación existente entre muestras de suelo de diferentes procedencias.

1.3.1.2. *Análisis de la composición del agua de riego.*

La **Tabla 1.2** resume los resultados obtenidos de las distintas muestras de agua analizadas.

De los 31 elementos analizados en las muestras de agua, 18 mostraron valores por debajo del LD y/o LC (Cs, Ga, Lu, Nd, Ni, Pb, Se, Tl, Yb, Al, Cd, Ce, Co, La, Mo, Nd, Rb y Sm). Sodio fue el elemento mayoritario en todas las muestras estudiadas, seguido por Ca, Mg y K.

B, Ba, Cu, Eu, Li, Mg, U y Zn mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las 3 provincias analizadas, siendo las concentraciones de B, Li y U más altas en muestras provenientes de Córdoba y más bajas en aguas procedentes de Buenos Aires, mostrando Entre Ríos valores intermedios. Ba, Cu, Eu y Zn mostraron valores más bajos en muestras provenientes de Córdoba, pero las aguas de Entre Ríos presentaron los valores más altos, seguidos por los de Buenos Aires. Las muestras provenientes de Córdoba también mostraron los valores más bajos de Ca, pero este elemento no mostró diferencias significativas en muestras de Entre Ríos y Buenos Aires.

Por otro lado Mn, Na y V fueron similares en aguas procedentes de Córdoba y Entre Ríos, pero las muestras de Buenos Aires presentaron los valores más bajos de Mn y Na, y el más alto de V. Finalmente K y Sr no mostraron diferencias significativas entre muestras de Buenos Aires y Córdoba, pero las muestras de Entre Ríos presentaron las concentraciones más bajas de estos.

Tabla 4.2. Promedio y desviación estándar de los elementos medidos ($\mu\text{g/L}$) y las relaciones isotópicas (unidad δ , ‰ por mil) correspondientes a las muestras de agua analizadas en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Entre Ríos.

Variable	Buenos Aires	Córdoba	Entre Ríos
Al	<LC	30 ± 30 a	<LD
B	90 ± 60 c	600 ± 400 a	260 ± 140 b
Ba	110 ± 30 b	50 ± 40 c	210 ± 100 a
Ca	(75 ± 13) x 10 ³ a	(60 ± 30) x 10 ³ b	(70 ± 17) x 10 ³ a
Cd	<LC	<LC	<LC
Ce	<LC	0,3 ± 0,6 a	<LD
Co	<LC	<LC	<LC
Cs	<LD	<LD	<LD
Cu	16 ± 20 b	3 ± 3 c	40 ± 40 a
Eu	0,021 ± 0,015 b	0,012 ± 0,014 c	0,038 ± 0,023 a
Ga	<LD	<LD	<LD
K	8000 ± 2300 a	8000 ± 4000 a	3600 ± 2000 b
La	<LC	<LC	<LD
Li	15 ± 6 c	40 ± 40 a	28 ± 10 b
Lu	<LD	<LD	<LD
Mg	(37 ± 5) x 10 ³ a	(17 ± 11) x 10 ³ b	(12 ± 3) x 10 ³ c
Mn	3 ± 6 b	9 ± 14 a	6 ± 13 a
Mo	<LC	7 ± 11 a	<LC
Na	(4,1 ± 1,9) x 10 ⁴ b	(12 ± 10) x 10 ⁴ a	(10 ± 5) x 10 ⁴ a
Nd	0,07 ± 0,25 b	0,2 ± 0,3 a	<LD
Ni	<LD	<LC	<LD
Pb	<LD	0,4 ± 0,4 a	1,2 ± 1,9 b
Rb	2,0 ± 0,9 a	1,9 ± 1,1 a	<LC
Se	<LD	1 ± 3 a	<LD
Sm	<LC	0,03 ± 0,07 a	<LD
Sr	750 ± 120 a	3000 ± 15000 a	700 ± 210 b
Tl	<LD	<LD	<LD
U	6 ± 6 c	40 ± 60 a	12 ± 8 b
V	63 ± 18 a	50 ± 50 b	36 ± 12 b
Yb	<LD	<LC	<LD
Zn	130 ± 240 b	40 ± 100 c	400 ± 700 a
Ca/Sr	102 ± 18 b	110 ± 70 a	103 ± 15 a
K/Rb	5000 ± 3000 a	4600 ± 2000 a	2400 ± 1000 b
d²H	-30,1 ± 2,4 b	-25,2 ± 4,3 a	-26,5 ± 1,9 a
d¹⁸O	-5,4 ± 0,4 c	-4,7 ± 0,9 a	-5,1 ± 0,3 b
⁸⁷Sr/⁸⁶Sr	0,7071 ± 0,0003 c	0,7133 ± 0,0028 a	0,7078 ± 0,0003 b

<LD, menor al límite de detección, <LC, menor al límite de cuantificación. LD instrumental ($\mu\text{g/L}$): Al (4), Ce (0,02), Cs (0,05), Ga (0,1), La (0,05), Lu (0,003), Nd (0,02), Ni (0,4), Pb (0,1), Se (0,2), Sm (0,009), Tl (0,09) y Yb (0,007). LC instrumental ($\mu\text{g/L}$): Al (12), Cd (0,09), Ce (0,06), Co (0,1), La (0,15), Mo (0,7), Ni (1,1), Rb (1,8), Sm (0,03) y Yb (0,02). Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

También se encontraron variaciones en las relaciones de Ca/Sr y K/Rb. La relación Ca/Sr fue significativamente menor en muestras provenientes de Buenos Aires, y similar en aquellas procedentes de Córdoba y Entre Ríos, mientras que K/Rb fue menor en aguas de Entre Ríos, y similar en aquellas procedentes de Córdoba y Buenos Aires.

El análisis de la relación isotópica $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ también manifestó diferencias significativas entre muestras de distinta procedencia, siendo superior en muestras de la provincia de Córdoba, intermedia en muestras de Entre Ríos, y las muestras de Buenos Aires mostraron los valores más bajos.

El análisis elemental y el análisis isotópico de las muestras de agua demuestran que existen diferencias entre muestras provenientes de distintas regiones. Al igual que para las muestras de suelo se recurrió al ADS para verificar si estas diferencias pueden distinguir una muestra proveniente de una dada región, de otra de distinto origen. Se eligió la metodología *forward stepwise*, (F para aceptar = 11; Tolerancia = 0,01; N° de etapas = 17). En la **Figura 1.3** se muestra el diagrama de dispersión generado por este análisis. De las 17 variables utilizadas para este análisis (B, Ba, Ca, Cu, Eu, K, Li, Mg, Mn, Na, Sr, U, V, Zn, Ca/Sr, K/Rb y $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$), sólo 5 fueron necesarias para discriminar el 99,2 % de las muestras de agua analizadas: $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, Mg, Li, Ba y Na. De estas, $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, Ba, Li y Mg son capaces de diferenciar las tres áreas de estudio, mientras que Na permite diferenciar las muestras de Buenos Aires (**Tabla 1.2**).

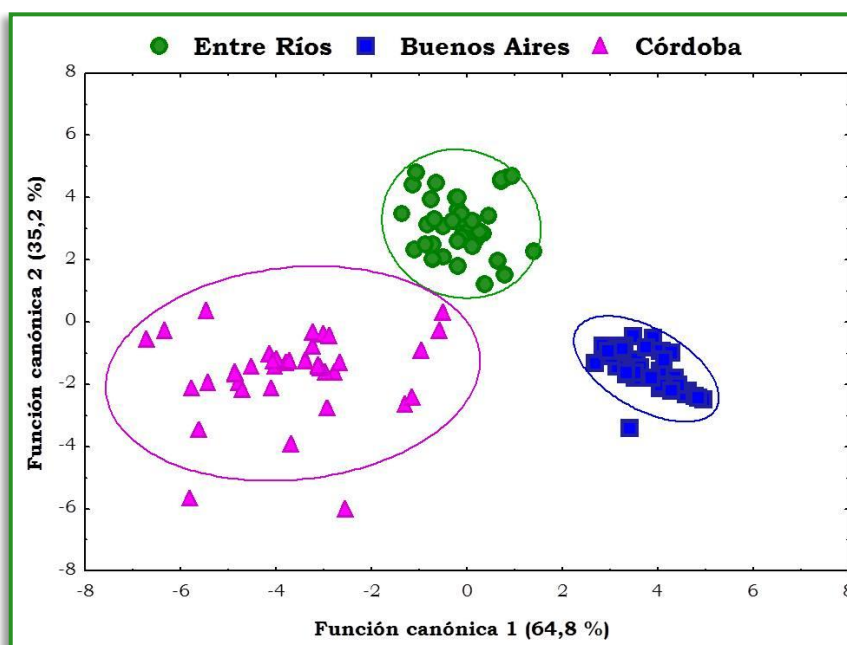


Figura 1.3. Diagrama de dispersión de dos funciones discriminantes canónicas, las cuales muestran la separación existente entre muestras de agua de diferentes procedencias.

Ba, Na y la relación $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ también fueron importantes para discriminar las muestras de suelo, y tanto en agua como en suelo presentaron el mismo perfil en las tres regiones analizadas (**Figura 1.4**), demostrando una correlación entre ambas matrices.

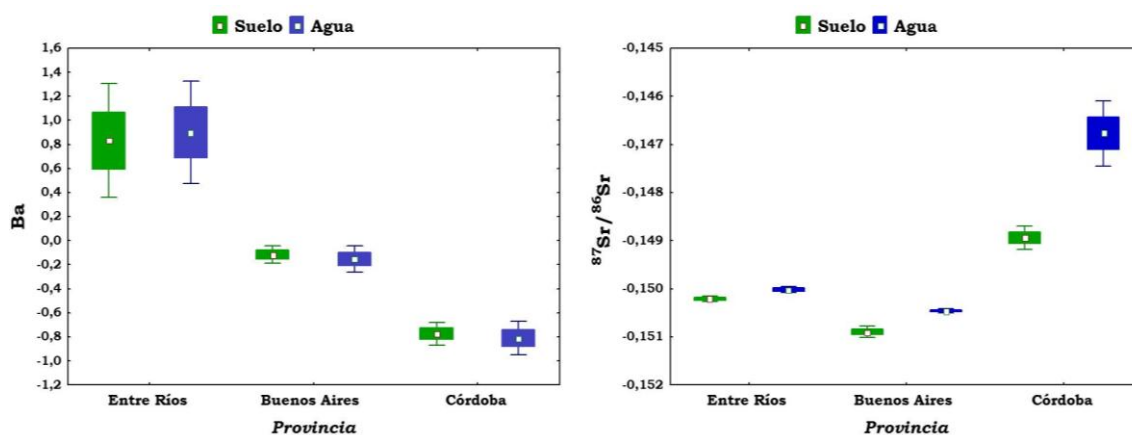


Figura 1.4. Gráficos de caja para representar los valores estandarizados de Ba (izquierda) y $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ (derecha), para muestras de suelo y agua. La caja representa los valores promedios \pm el error estándar (EE); las líneas representan el promedio \pm 1,96 EE.

Se ha observado que las muestras de suelo y agua donde se cultivan las muestras de trigo son claramente diferentes en las tres regiones consideradas para este estudio. Teniendo en cuenta que la región geográfica puede influir sobre la composición elemental e isotópica de distintos alimentos (Baroni *et al.*, 2011; Di Paola-Naranjo *et al.*, 2011), el siguiente objetivo fue tratar de discriminar trigos provenientes de distinto origen geográfico, para evaluar si esas diferencias, encontradas en suelo y agua de distintas regiones, se trasladan a las muestras de trigo.

1.3.2. Caracterización de trigo argentino.

En la **Tabla 1.3** se resumen los resultados obtenidos de los constituyentes elementales e isotópicos de las muestras de trigo procedentes de Buenos Aires, Córdoba y Entre Ríos.

Tabla 1.3. Promedios y Desviaciones estándares de los elementos medidos ($\mu\text{g}/\text{kg}$) y las relaciones isotópicas (unidad δ , ‰ por mil) correspondientes a las muestras de trigo analizadas en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Entre Ríos.

Variables	Buenos Aires	Córdoba	Entre Ríos
Al	4000 \pm 2100 b	8000 \pm 7000 a	3100 \pm 1500 b
B	670 \pm 140 b	1000 \pm 500 a	430 \pm 200 c
Ba	9000 \pm 5000 a	5800 \pm 2000 b	8000 \pm 3000 a
Ca	(42 \pm 14) $\times 10^4$ b	(39 \pm 7) $\times 10^4$ b	(45 \pm 6) $\times 10^4$ a
Cd	9 \pm 5 c	12 \pm 6 b	18 \pm 8 a
Ce	4 \pm 3 b	7 \pm 7 a	3 \pm 7 b
Co	9 \pm 10 b	22 \pm 12 a	10 \pm 6 b
Cs	<LC c	3 \pm 3 b	15 \pm 10 a
Cu	4500 \pm 700 b	3900 \pm 800 c	5300 \pm 500 a
Eu	2,7 \pm 0,7 a	1,7 \pm 0,8 b	1,1 \pm 0,4 c
Ga	11,4 \pm 0,8 a	<LD	<LD
K	(41 \pm 8) $\times 10^5$ a	(40 \pm 6) $\times 10^5$ b	(40 \pm 6) $\times 10^5$ a
La	4 \pm 4 b	5 \pm 6 a	3 \pm 5 b
Li	8,8 \pm 2,3 c	70 \pm 40 a	24 \pm 5 b
Lu	<LD	<LD	<LD
Mg	(12,5 \pm 1,3) $\times 10^5$ a	(12,1 \pm 1,8) $\times 10^5$ b	(12,3 \pm 1,8) $\times 10^5$ a
Mn	(40 \pm 12) $\times 10^3$ b	(42 \pm 12) $\times 10^3$ a	(41 \pm 10) $\times 10^3$ a
Mo	420 \pm 210 b	900 \pm 300 a	800 \pm 250 a
Na	(19 \pm 8) $\times 10^3$ a	(12 \pm 6) $\times 10^3$ b	(9 \pm 3) $\times 10^3$ b
Nd	1,9 \pm 1,5 b	4 \pm 3 a	2 \pm 3 b
Ni	500 \pm 700 a	290 \pm 70 b	390 \pm 130 a
Pb	13 \pm 40 b	30 \pm 80 a	14 \pm 18 b
Rb	(20 \pm 5) $\times 10^2$ b	(13 \pm 4) $\times 10^2$ c	(12 \pm 5) $\times 10^3$ a
Se	<LC	190 \pm 140 a	<LC
Sm	<LC	<LC	<LC
Sr	2800 \pm 900 c	4700 \pm 1500 a	3500 \pm 800 b
Tl	<LD	<LD	<LD
U	<LD	<LD	<LD
V	<LD	<LD	<LD
Yb	1,37 \pm 0,10 a	0,9 \pm 0,7 b	<LD
Zn	(30 \pm 4) $\times 10^3$ a	(24 \pm 6) $\times 10^3$ b	(26 \pm 5) $\times 10^3$ b
Ca/Sr	170 \pm 90 a	90 \pm 30 c	130 \pm 19 b
K/Rb	2100 \pm 600 b	3200 \pm 600 a	390 \pm 170 c
$\delta^{13}\text{C}$	-24,4 \pm 1,1 b	-23,9 \pm 0,8 a	-24,7 \pm 0,9 b
$\delta^{15}\text{N}$	3,3 \pm 1,0 a	2,9 \pm 0,9 b	3,8 \pm 0,9 a
$^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$	0,7073 \pm 0,0005 c	0,7089 \pm 0,0005 a	0,7080 \pm 0,0004 b

<LD, menor al límite de detección. <LC, menor al límite de cuantificación. LD instrumental ($\mu\text{g}/\text{kg}$): Ga (1,5), Lu (0,05), Tl (0,5), U (2,5), V (50,0) y Yb (0,15). LC instrumental ($\mu\text{g}/\text{kg}$): Se (166,7) and Sm (0,83). Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

1.3.2.1. *Análisis Multi-elemental.*

Seis de los 31 elementos analizados en las muestras de trigo presentaron valores por debajo del límite de detección (LD), ellos fueron Ga, Lu, Tl, U, V y Yb. Por otro lado, Cs, Se y Sm mostraron valores por debajo del límite de cuantificación.

El potasio fue el elemento más abundante en todas las muestras de trigo analizadas, seguido por Mg, Ca, Mn, Zn y Na. Estos resultados concuerdan con otros reportados en muestras de trigo procedentes de China (Zhao *et al.*, 2011) y Dinamarca (Laursen *et al.*, 2011).

Muchos elementos mostraron diferencias significativas de acuerdo con la procedencia del trigo. Siete elementos (B, Cu, Cd, Eu, Li, Rb, y Sr) fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre las tres regiones estudiadas. Las concentraciones de B, Li y Sr fueron más altas en trigos de Córdoba, mientras que las muestras de Entre Ríos presentaron las concentraciones más bajas de B, y las de Buenos Aires las más bajas de Li y Sr. Cd, Cu y Rb mostraron los valores más altos en trigos de Entre Ríos, mientras que las muestras de Córdoba presentaron los valores más bajos de Cu y Rb y las de Buenos Aires los valores más bajos de Cd. El elemento Eu fue más abundante en muestras procedentes de Buenos Aires, seguidas de muestras de Córdoba y luego de Entre Ríos.

Por otro lado, Al, Ce, Co, La, Nd y Pb presentaron los valores más altos en trigos de Córdoba, mientras que en Buenos Aires y Entre Ríos tenían valores bajos similares. Por el contrario, Ba, K, Mg y Ni mostraron concentraciones mayores en Buenos Aires y Entre Ríos en comparación con Córdoba. Además, las muestras de Buenos Aires presentaron concentraciones más altas de Na y de Zn en comparación con las de Córdoba y Entre Ríos, mientras que los trigos de Entre Ríos mostraron los valores más altos de Ca. Finalmente, las muestras de Córdoba y Entre Ríos mostraron valores similares de Mn y Mo, siendo estos más bajos en muestras de Buenos Aires.

También se encontraron variaciones en las relaciones de Ca/Sr y K/Rb. La relación Ca/Sr fue mayor en muestras provenientes de Buenos Aires, intermedia en aquellas provenientes de Entre Ríos, y más baja en muestras de Córdoba, mientras que K/Rb fue menor en trigos de Entre Ríos, intermedia en trigos de Buenos Aires, y más alta en aquellos procedentes de Córdoba.

Como se describió anteriormente (**Sección 1.1.1.2**, Isótopos del Sr), Sr y Rb pueden reemplazar a Ca y K en la composición de las rocas, desde donde las plantas pueden tomarlos. Sin embargo, Ca y K son elementos esenciales para la vida vegetal, pero Sr y Rb no tienen un rol biológico en estas (Dunn, 2007), no pueden reemplazar al Ca y al K en las funciones bioquímicas de la planta (Kabata-Pendias, 2001). Aunque Rb y Sr ingresan a la planta por la misma vía que K y Ca respectivamente, los mecanismos de absorción, transporte y secreción discriminan entre K y Rb y entre Ca y Sr (Nyholm & Tyler, 2000), y la mayoría de los sistemas biológicos prefieren la captación de elementos esenciales sobre los

que no tienen ningún rol biológico (Burton *et al.*, 1999). Esto resulta en valores más altos de las relaciones K/Rb y Ca/Sr en tejido vegetal con respecto a suelos (**Tabla 1.1** y **Tabla 1.3**).

Esta absorción también depende en gran medida de las propiedades del suelo, como la disponibilidad de Ca y K (mientras más alto es el contenido de Ca y K en el suelo, menor es la absorción de Sr y Rb), la capacidad de adsorción y principalmente del pH (Peltola *et al.*, 2008). Así por ejemplo la biodisponibilidad del K se ve afectada en suelos ácidos, ya que en estos se produce una pérdida por lixiviado del ion K^+ y por consiguiente hay un incremento en la captación de Rb por parte de las plantas.

1.3.2.2. **Composición isotópica.**

↳ **Composición isotópica de carbono.**

En las muestras de trigo analizadas se observó una diferencia significativa en los valores de $\delta^{13}C$ de acuerdo al lugar de procedencia, siendo mayor en muestras provenientes de Córdoba ($-23,9 \pm 0,8\%$) con respecto a muestras de Buenos Aires ($-24,4 \pm 1,1\%$) y Entre Ríos ($-24,7 \pm 0,9\%$) (**Tabla 1.3**). Esta variación puede estar relacionada al entorno geográfico, y a las condiciones climáticas.

Los valores $\delta^{13}C$ en una planta, y por consiguiente en sus frutos, aumentan con el aumento del número de días de sol, el aumento de la temperatura media, y la disminución del promedio de la humedad (Jonasson *et al.*, 1997; O'Leary, 1995). El área de cultivo en Córdoba, donde se recolectaron las muestras de trigo, está situada cerca de una región semiárida, con un clima templado serrano. En esta región, los cultivos a menudo se ven afectados por sequías y las temperaturas medias anuales suelen ser más altas que en las regiones cultivadas de Entre Ríos y Buenos Aires. Lo mismo ocurre con la humedad, hay una disminución en el promedio de humedad en esta provincia con respecto a las otras dos, donde prevalece el clima templado pampeano húmedo. Estas condiciones serían las responsables del aumento en $\delta^{13}C$ encontrado en muestras de Córdoba con respecto a las provenientes de Entre Ríos y Buenos Aires.

Los cambios en $\delta^{13}C$ de trigo debido a las diferencias en $\delta^{13}C$ de suelos deben desecharse, ya que la principal fuente de carbono para las plantas, en particular del trigo, surge de la CO_2 atmosférico (**Sección 1.1.1.2**, Relación isotópica del carbono) (Larsen *et al.*, 2007).

↳ **Composición isotópica del nitrógeno.**

Los resultados obtenidos de $\delta^{15}N$ se muestran en la **Tabla 1.3**. Los valores de $\delta^{15}N$ en muestras de trigo provenientes de Córdoba ($2,9 \pm 0,9\%$) fueron significativamente menores a los valores obtenidos en muestras de Buenos Aires ($3,3 \pm 1,0\%$) y Entre Ríos ($3,8 \pm 0,9\%$).

Muchos estudios han demostrado que $\delta^{15}\text{N}$ puede actuar como un trazador químico, ya que provee información sobre las prácticas agrícolas de cada región (Fraser *et al.*, 2011) (Ver **Sección 1.1.1.2**, Relación isotópica del nitrógeno). Esto se debe a que uno de los factores que más afectan la composición isotópica del nitrógeno en un suelo es el uso de fertilizantes. Distintas fuentes de N aplicadas a los sistemas agrícolas difieren en los valores de $\delta^{15}\text{N}$ y esto modifica tanto los $\delta^{15}\text{N}$ del suelo como los de la planta (Senbayram *et al.*, 2008).

Las diferencias encontradas en los valores de $\delta^{15}\text{N}$ en este estudio pueden ser atribuidas a las diferentes prácticas agrícolas regionales adoptadas. En Córdoba está más difundido el uso de fertilizantes químicos, mientras que en las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos se emplean fertilizantes orgánicos, los cuales presentan valores superiores de $\delta^{15}\text{N}$ (Baroni *et al.*, 2011).

De todas formas, la variación en los valores de $\delta^{15}\text{N}$ en plantas es generalmente bastante difícil de explicar, porque no solo pueden estar afectados por los fertilizantes, sino también, en menor medida, por otras fuentes de N en el suelo, la profundidad a la cual la planta toma el N y la deposición atmosférica del amonio (Senbayram *et al.*, 2008).

↳ **Composición Isotópica de estroncio.**

En la **Tabla 1.3** se muestran los valores de $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ para las muestras de trigo de las tres regiones estudiadas. Se puede observar que las muestras de trigo de Buenos Aires presentan el valor más bajo de esta relación ($0,7073 \pm 0,0005$), mientras que las muestras de Córdoba presentan el valor más alto ($0,7089 \pm 0,0005$). Las muestras de Entre Ríos tienen un valor $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ entre estos dos grupos ($0,7080 \pm 0,0004$). Estas proporciones de isótopos pueden ser explicadas por las diferencias en el material del suelo parental de cada región, de hecho estos datos están altamente correlacionados con los encontrados en suelos procedentes del mismo lugar de origen (ver **Sección 1.3.1.1**).

La relación isotópica del estroncio ($^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$) refleja las características geoquímicas del suelo en el cual una planta se desarrolla. Depende del tipo de roca y de la composición del suelo, y no es afectada por la actividad humana o el clima (Rossmann *et al.*, 2000). En el análisis isotópico convencional, la relación $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ es normalizada con una relación fija de $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ (Faure, 1986) y con el empleo de estándar isotópico de referencia. Esto corrige cualquier fraccionamiento experimental o fraccionamiento natural dependiente de la masa, haciendo de $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ un buen trazador de origen.

Los suelos argentinos están mayoritariamente constituidos por loess (material geológico sedimentario eólico) (Zárate, 2003). Se sabe que la caída de cenizas volcánicas es un constituyente importante del loess sudamericano, de hecho, la composición isotópica del Sr del loess pampeano argentino está muy cerca de la roca volcánica de los Andes centrales del sur ($0,704$ a $0,707$), procedente de rocas andesíticas y basálticas, lo que sugiere que se derivaron de esta fuente (Smith *et al.*, 2003).

Sin embargo, existen pequeñas contribuciones de otras fuentes minerales en cada región. En Buenos Aires, el valor de la relación $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ en muestras de trigo está influenciado por pequeñas cantidades de material derivado de los cordones montañosos Tandilia y Ventania (Zárate, 2003). Por otro lado, estudios basados en el tamaño del sedimento y mineralogía sugieren que las muestras de Entre Ríos podrían estar influenciadas por minerales provenientes de las Sierras Pampeanas y la cuenca del Río Paraná-Uruguay (Morrás, 1999). La relación isotópica del Sr en la provincia de Córdoba sugiere la contribución de partículas derivadas de sedimentos originados en las Sierras Pampeanas, constituidas mayoritariamente por rocas graníticas del Paleozoico, con rangos de isótopos del Sr de 0,707 a 0,809 (Baroni *et al.*, 2011).

Otro punto importante a destacar, es el hecho de que las muestras de trigo provenientes de Córdoba presentan valores de la relación $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ más bajas que las muestras de suelo y agua tomada en el mismo lugar de cultivo. La agricultura en la provincia de Córdoba se caracteriza por el uso de fertilizantes químicos, entre los cuales destacan los fertilizantes fosfatados. Estos son generados a partir de fosforita la cual presenta relaciones $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ entre 0,7073 y 0,7078. Si se utiliza un modelo simplificado de una mezcla de suelo (agua) y fosforita, los resultados isotópicos obtenidos son consistentes con las proporciones de isótopos de Sr encontradas en muestras de trigo provenientes de Córdoba, por lo que sería razonable pensar que el Sr derivado de estos fertilizantes, que se ha suministrado a los suelos, y el agua, llega a la planta, y por consiguiente al grano de trigo.

El análisis elemental y el análisis isotópico de las muestras de trigo muestran diferentes patrones para diversas áreas de producción agrícola. Estos patrones parecen estar de acuerdo con la geología, hidrogeología, y el medio ambiente, además de las diferentes prácticas agrícolas, por consiguiente, a través de herramientas estadísticas multivariadas, las cuales permiten analizar simultáneamente todas las variables de una o más muestras teniendo en cuenta las interacciones antagónicas y sinérgicas que existen entre ellas, se evaluó la posibilidad de discriminar las muestras de trigo según su origen.

1.3.2.3. Discriminación geográfica de trigo por tratamiento multivariado.

El perfil elemental e isotópico del trigo (Al, B, Ba, Ca, Cd, Ce, Co, Cu, Eu, K, La, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Nd, Ni, Pb, Rb, Sr, Zn, Ca/Sr, K/Rb, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ y $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$) fue analizado, utilizando quimiometría (**Anexo I**), para investigar si era posible discriminar muestras de diferentes regiones.

↪ Análisis exploratorios.

Los análisis exploratorios se utilizaron para evaluar la estructura de datos, la relación entre muestras y variables, y para verificar si el análisis elemental y la información isotópica podían ser adecuados para clasificar muestras de trigo procedentes de distintas regiones geográficas.

Análisis de Conglomerados (AC).

Una primera evaluación exploratoria de la estructura de datos se llevó a cabo por AC. Los resultados obtenidos se presentan como un dendrograma, el cual se expone en la **Figura 1.5**. Este gráfico muestra que la disposición de muestras en el eje “y” no es al azar. Las muestras de diferentes regiones se dividieron en cuatro grupos (A-D) formados a una distancia de Gower de 1,63 (50% de la distancia total de ligamiento). Las muestras incluidas en el grupo A fueron todas procedentes de Córdoba, mientras que la categoría D incluyó muestras provenientes de Entre Ríos. Las muestras de Buenos Aires se dividieron en dos grupos; la mayoría de ellas estaban en el grupo B, mientras que unas pocas estaban en el grupo C. Estas últimas muestran mayor similitud con las muestras de Entre Ríos que con las muestras de Buenos Aires.

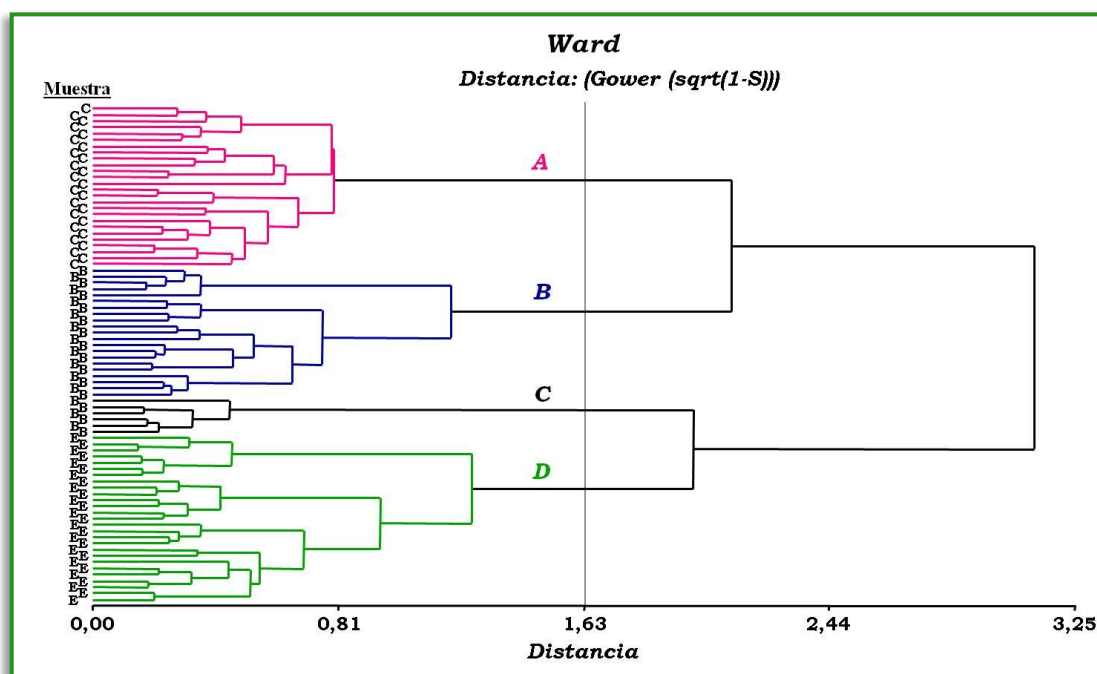


Figura 1.5. Gráfico de dendrograma. Muestras de trigo de distinta procedencia. B indican muestras de Buenos Aires, C indican muestras de Córdoba y E son muestras de Entre Ríos.

Análisis de componentes principales (ACP).

El modelo generado a partir del ACP utilizó cuatro nuevas variables (componentes principales, CP), para explicar el 61 % de la variabilidad encontrada en los datos analizados. En la **Figura 1.6** se muestra una representación gráfica (*biplot*) de este análisis. La primer componente principal (CP1) explicó el 20 % de la varianza total de los datos mientras que la segunda componente principal (CP2) explicó el 17% de esta.

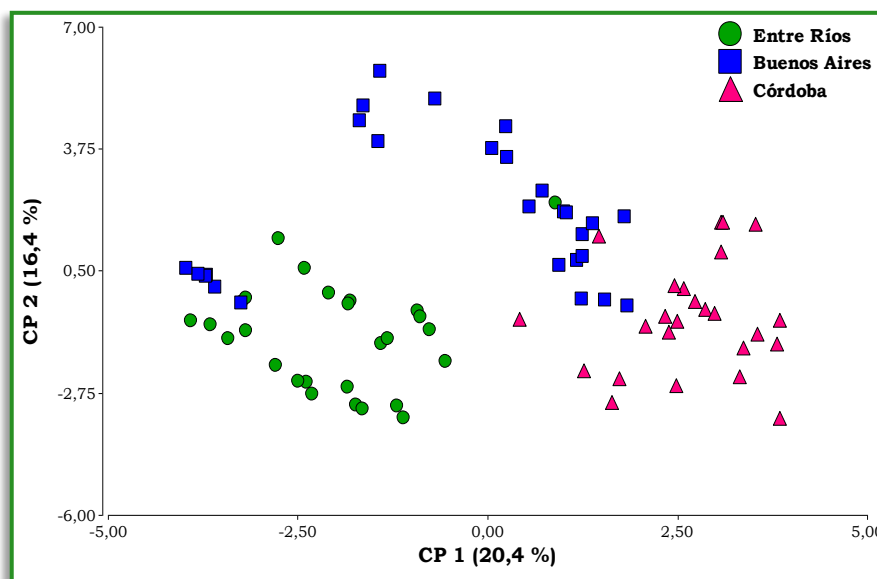


Figura 1.6. Diagrama de componentes principales para muestras de trigo.

Los autovectores (e_1 y e_2) arrojados por el análisis indican los coeficientes con que cada variable original fue ponderada para conformar la CP 1 y CP2. Por lo tanto se puede decir que los valores absolutos de e_1 y e_2 proporcionan la importancia de cada variable en la CP 1 y CP 2, respectivamente. En la **Tabla 1.4** se muestran los autovectores (e_1 y e_2) arrojados por el ACP. Se puede observar que las variables Ca, Cu, Rb y K/Rb son las que más aportan a la CP1. En oposición, Eu, Mo y Na, poseen un valor absoluto elevado del coeficiente e_2 , lo que indicaría que estas variables explican la variabilidad de las muestras en la CP 2.

Este análisis mostró que a grandes rasgos las muestras de trigo podían ser separadas en tres grupos. La CP1 permitiría separar la mayoría de las muestras provenientes de Córdoba con aquellas procedentes de la provincia de Entre Ríos, sin embargo las muestras de Buenos Aires sería más difíciles de separar.

Tabla 1.4. Autovectores e1 y e2 obtenidos para el ACP de extractos de diferentes variedades de trigo.

Variables	e1	e2
Al	0,19	0,15
B	0,23	0,04
Ba	-0,07	0,30
Ca	-0,29	0,02
Cd	-0,15	-0,09
Ce	0,13	0,22
Co	0,13	-0,05
Cs	-0,22	-0,17
Cu	-0,32	-0,06
Eu	0,09	0,39
K	-0,01	0,26
La	0,06	0,19
Li	0,24	-0,18
Mg	-0,16	0,21
Mn	-0,14	0,14
Mo	0,02	-0,32
Na	0,05	0,35
Nd	0,14	0,16
Ni	-0,23	-0,03
Pb	0,00	-0,05
Rb	-0,28	-0,15
Sr	0,19	-0,14
Zn	-0,19	0,27
Ca/Sr	-0,26	0,17
K/Rb	0,36	0,10
$\delta^{13}\text{C}$	0,07	0,01
$\delta^{15}\text{N}$	-0,13	0,08
$^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$	0,23	-0,16

En general, los resultados de AC y ACP estuvieron de acuerdo en que hay cierta división entre las muestras, según su origen geográfico, lo que confirma que varios elementos y la información isotópica podrían ser adecuados para clasificar muestras de trigo de las tres regiones estudiadas. Adicionalmente, ambos análisis mostraron que un grupo de muestras de Buenos Aires se clasifican como muestras de Entre Ríos.

➤ Análisis clasificadorio.

Análisis Discriminante paso a paso (ADS).

La aplicación del análisis discriminante por pasos hacia adelante (*forward stepwise*: F para aceptar = 6; Tolerancia = 0,01; N° de etapas = 27) permitió discriminar las muestras de trigo de distinto origen con 11 de las 27 variables analizadas. La relación K/Rb fue la variable más importante para esta discriminación, seguida por Ca/Sr, Ba, $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, Co, Mo, Zn, Mn, Eu, $\delta^{13}\text{C}$ y Na. Algunas de estas variables (K/Rb, Mo, Eu y Na) también fueron elegidas por el ACP.

La aplicación del análisis discriminante canónico originó dos funciones discriminantes independientes por combinación lineal de estas variables. La combinación de estas dos funciones canónicas permitió la discriminación del 100 % de todas las muestras estudiadas. En la **Figura 1.7** se muestra el diagrama de dispersión generado a partir de estas funciones.

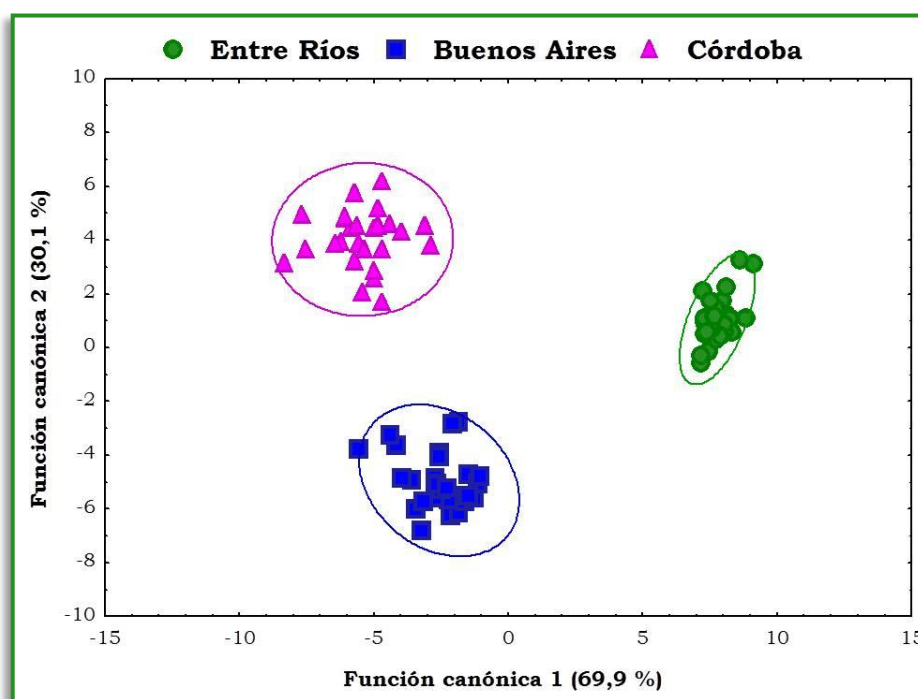


Figura 1.7. Diagrama de dispersión de dos funciones discriminantes canónicas, las cuales muestran la separación existente entre muestras de trigo de diferentes procedencias.

El 69,9 % de la variabilidad encontrada en los resultados fue explicada por la función canónica 1, donde K/Rb fue la variable más importante. Esta función permitió separar las muestras de Entre Ríos, de las de Buenos Aires y Córdoba. La función canónica

2, determinada principalmente por Ba, explicó el 30,1 % de la varianza total y mejoró la discriminación entre muestras de Córdoba y Buenos Aires.

De las variables elegidas por el ADS, Eu, K/Rb, Ca/Sr y $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ mostraron un perfil diferente en muestras de trigo procedentes de las tres regiones estudiadas. Ba, Co, y $\delta^{13}\text{C}$ permitieron la diferenciación de muestras de Córdoba de las de Buenos Aires y Entre Ríos. Por otro lado, Mo, Mn, Zn, y Na permitieron la diferenciación de las muestras de Buenos Aires de las de Córdoba y Entre Ríos (**Tabla 1.3**).

Las relaciones K/Rb y Ca/Sr, hasta donde se sabe, no habían sido utilizadas para determinar el origen de los alimentos. Nuestro grupo de trabajo, en el año 2011 los utilizó por primera vez para diferenciar muestras de vino a partir de tres regiones diferentes de Argentina, encontrando que la relación Ca/Sr era importante para la discriminación de origen de estas muestras (Di Paola-Naranjo *et al.*, 2011). Por otro lado, ese mismo año, estos marcadores se estudiaron en muestras de carne vacuna procedentes de la misma región geográfica analizada en esta tesis, encontrando que la relación Ca/Sr también contribuía a la discriminación de estas muestras (Baroni *et al.*, 2011). Tanto Ca/Sr como K/Rb también fueron importantes para discriminar muestras de trigos, por lo que su utilización para el estudio de la trazabilidad química de los alimentos es necesaria.

Ba y Mn están directamente vinculados a la geoquímica del suelo (Kment *et al.*, 2005) y son elementos importantes cuando la autenticación del origen geográfico se basa únicamente en datos multi-elementales (Aguilar *et al.*, 2011). Además, Laursen *et al.* (2011) encontraron diferentes concentraciones de Ba en muestras de trigo derivadas de diferentes lugares de Dinamarca. También Zhao *et al.* (2011) encontraron que Ba y Mn fueron buenos marcadores para discriminar muestras de trigo de cuatro regiones distintas de China.

La relación isotópica $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ha sido ampliamente utilizada como un marcador geoquímico. Sin embargo, existen pocos informes sobre el uso de esta relación para discriminar el origen de alimentos (o bebidas) (García-Ruiz *et al.*, 2007; Kawasaki *et al.*, 2002; Voerkelius *et al.*, 2010). Además, hasta donde se conoce, sólo el trabajo de Goitom Asfaha *et al.* (2011) utiliza este parámetro para discriminar el origen de muestras de trigo.

Por otra lado, se ha descripto que $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^{15}\text{N}$ fueron importantes para discriminar muestras de trigo de acuerdo a su origen geográfico (Brescia *et al.*, 2002). Sin embargo, otros investigadores no encontraron $\delta^{15}\text{N}$ como un buen indicador de origen geográfico (Branch *et al.*, 2003). De hecho, el modelo más simple de AD probado por ellos involucró sólo $\delta^{13}\text{C}$, lo que está de acuerdo con los resultados de esta tesis.

Por último, la concentración de Na en alimentos está asociada a la ocurrencia de pulverizaciones del mar y la deposición de sal marina (Goitom Asfaha *et al.*, 2011). En los resultados obtenidos en esta tesis, las muestras de Buenos Aires presentaron valores más altos de Na en comparación con trigos provenientes de Córdoba y Entre Ríos (**Tabla 1.3**). Esto podría atribuirse a la proximidad de la zona de muestreo en Buenos Aires a la costa del océano, además de la influencia de los vientos marinos.

1.3.3. Correlación entre la composición multi-elemental e isotópica de muestras de suelo, agua y trigo.

El perfil elemental y la composición isotópica en el trigo refleja la geoquímica local del suelo y el agua de riego empleada, pero también pueden estar influenciados por la variedad del cereal, el clima y las prácticas agrícolas (Goitom Asfaha *et al.*, 2011; Zhao, 2006). Por lo que el siguiente objetivo fue evaluar la correlación entre el perfil químico inorgánico del suelo y del agua de la zona de producción estudiada, con el perfil químico inorgánico de las muestras de trigo cultivadas en ese mismo lugar, para ver si las diferencias encontradas en trigo se correspondían con las encontradas en suelo y agua.

Analizando las **Tablas 1.1, 1.2 y 1.3** se encuentra que algunos elementos e isótopos muestran una buena correspondencia entre suelo, agua y trigo en las tres regiones estudiadas. Por ejemplo, las muestras de trigo, suelo, y agua de Córdoba muestran los valores más altos en $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, las muestras de Buenos Aires presentan los más bajos, mientras que las muestras de Entre Ríos muestran valores intermedios. En la **Figura 1.8 A** se puede observar esta correspondencia. Por otro lado, Mg mostró el mismo perfil en muestras de suelo y trigo, pero no en agua (**Figura 1.8 B**), esto mismo ocurre con Ca y la relación K/Rb, mientras que Cu (**Figura 1.8 C**), Li y Mn presentaron buena correspondencia entre las muestras de agua y trigo, pero no con las muestras de suelo.

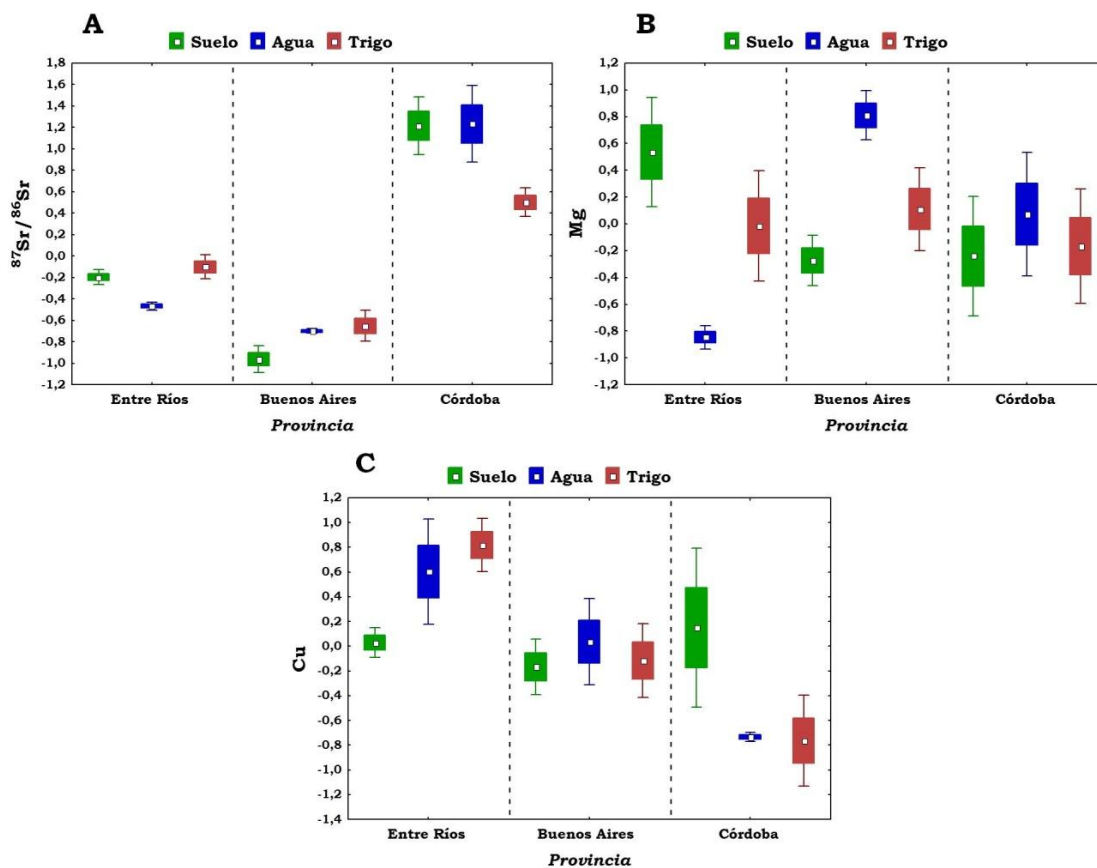


Figura 1.8. Correspondencia entre niveles de algunos elementos e isótopos en suelo, agua y trigo de diferentes regiones geográficas. Valores estandarizados, Promedio \pm EE. A: Valores de $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$; B: Valores de Mg; C: Valores de Cu.

Para buscar evidencia adicional sobre la correspondencia entre las tres matrices estudiadas, se estudiaron los datos a través de un análisis estadístico exploratorio, el Análisis de Procrustes Generalizado (APG). Este análisis produce una configuración de las distintas regiones geográficas que refleja el consenso entre las tres matrices (suelo, agua y trigo). El resultado es un alineamiento de consenso que usa todos los elementos e isótopos de los tres grupos de datos. En la **Figura 1.9** se muestra la configuración de consenso proyectada sobre el plano definido por el primer y segundo eje principal, explicando el 100 % de la variabilidad entre las muestras. En esta figura se observa que los tres orígenes geográficos están bien separados debido a la composición elemental e isotópica de suelo, agua, y trigo. Los resultados del análisis muestran que los datos obtenidos a partir de trigo tienen un consenso significativo (99,2 %) con los obtenidos de suelo y agua, ya que los tres conjuntos de datos en las 3 regiones estudiadas, se proyectan de la misma manera en el plano definido por los 2 ejes principales. Este último resultado provee un indicio adicional de la conexión entre las tres matrices estudiadas.

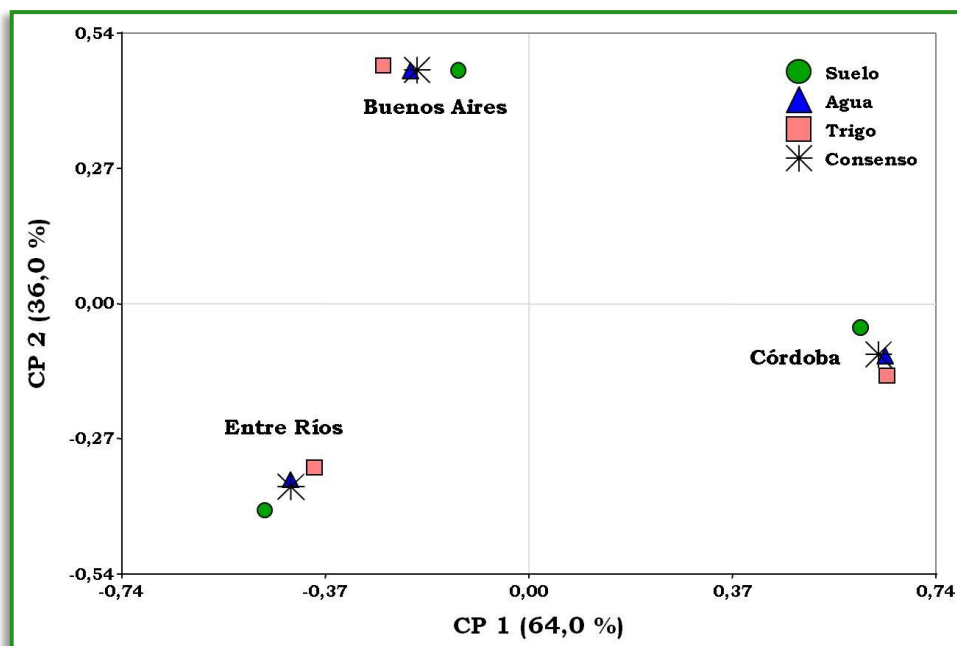


Figura 1.9. Espacio de consenso del Análisis de Procrustes generalizado: gráfico del plano definido por las primeras 2 dimensiones.

Para evaluar la correspondencia entre suelo, agua, y la composición de trigo usando un enfoque matemático-estadístico más formal, se aplicó un Análisis de Correlación Canónica (ACC).

El primer ACC se realizó para conocer la correlación existente entre muestras de suelo y trigo. Para esto se definieron dos conjuntos de variables, un conjunto para trigo y otro para suelo utilizando 23 variables comunes (Al, B, Ba, Ca, Ce, Co, Cu, Eu, K, La, Li, Mg, Mn, Na, Nd, Rb, Sr, Zn, Ca/Sr, K/Rb, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ y $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$). Este análisis mostró una correlación significativa ($r^2 = 0,97$, $p < 0,001$) entre estos dos tipos de muestras. El contenido de Eu, K/Rb, Ba y K en suelo, así como Mn, Rb, Cu y Zn en trigo mostraron cargas sustanciales en el primer factor canónico; es decir, se correlacionan altamente con este factor, lo que significa que estas variables son las que más contribuyen a la correlación encontrada entre las muestras de suelo y trigo (**Tabla 1.5 A**).

El segundo ACC se realizó para determinar la correlación entre muestras de agua y trigo, utilizando 15 variables comunes (B, Ba, Ca, Cu, Eu, K, Li, Mg, Mn, Na, Sr, Zn, Ca/Sr, K/Rb y $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$). Los resultados de este análisis mostraron una correlación significativa ($r^2 = 0,96$, $p < 0,001$) entre los datos de agua y los de trigo. De acuerdo con las cargas sobre el primer factor canónico, el contenido de Ca, B, y Mg en agua, así como la relación K/Rb y Ca en el trigo fueron las variables que más contribuyeron a la correlación (**Tabla 1.5 B**).

Tabla 1.5. Contribución de cada variable al primer factor canónico entre datos de suelo y trigo (A), y entre datos de agua y trigo (B).

A			B		
	Suelo	Trigo		Agua	Trigo
Al	-0,2033	-0,3256	B	0,5164	-0,0458
B	-0,0673	0,1623	Ba	-0,0198	-0,0389
Ba	-0,5632	-0,1946	Ca	-0,5406	-0,5476
Ca	-0,0813	0,2702	Cu	-0,0693	0,316
Ce	-0,0101	0,1712	Eu	0,0363	0,3356
Co	0,2045	0,1267	K	0,3906	-0,1531
Cu	0,1404	-0,5138	Li	0,0201	-0,24
Eu	1,0424	-0,0349	Mg	0,4889	0,1578
K	0,4682	0,0454	Mn	-0,1107	0,2977
La	-0,1131	-0,0507	Na	-0,3409	-0,0638
Li	-0,2096	-0,0603	Sr	0,1873	0,1394
Mg	-0,0852	0,3278	Zn	0,1155	-0,2833
Mn	-0,0928	-0,569	Ca/Sr	0,2825	-0,0272
Na	0,0905	-0,0246	K/Rb	-0,0776	-0,9636
Nd	0,2028	-0,1135	⁸⁷Sr/⁸⁶Sr	0,3197	-0,0276
Rb	-0,3377	-0,5167			
Sr	0,2991	0,1531			
Zn	0,091	0,435			
Ca/Sr	0,0612	0,1884			
K/Rb	-0,5991	0,2394			
$\delta^{13}\text{C}$	0,1619	0,0885			
$\delta^{15}\text{N}$	0,1936	0,0336			
⁸⁷Sr/⁸⁶Sr	0,0482	-0,0042			

El estudio de los datos a través de métodos estadísticos multivariados (APG y ACC) mostró que hay una importante influencia del suelo y del agua en la composición multi-elemental e isotópica del trigo.

A priori, el estudio de la composición elemental e isotópica de muestras de suelo y agua provenientes de una dada región, brindarían la posibilidad de predecir científicamente la composición de muestras de trigo procedentes de la misma región geográfica.

1.4. CONCLUSIONES.

En este capítulo se determinaron las proporciones de isótopos y las concentraciones de elementos en 130 muestras de suelo, 120 de agua y 80 de trigo provenientes de origen geográfico distinto (Buenos Aires, Córdoba y Entre Ríos). Las 36 variables estudiadas fueron: Al, B, Ba, Ca, Cd, Ce, Co, Cs, Cu, Eu, Ga, K, La, Li, Lu, Mg, Mn, Mo, Na, Nd, Ni, Pb, Rb, Se, Sm, Sr, Tl, U, V, Yb, Zn, K/Rb, Ca/Sr, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ y $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, algunas de las cuales presentaron diferencias significativas en las tres matrices analizadas, en función de la región de origen.

La caracterización del área de muestreo a través del estudio del suelo y el agua de riego, permitió encontrar diferencias significativas en la composición elemental e isotópica de las distintas regiones estudiadas. A través de ADS se logró discriminar el 100 % de las muestras de suelo analizadas a través de 14 variables ($\delta^{13}\text{C}$, Eu, Ba, Tl, Mn, $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, Ca/Sr, $\delta^{15}\text{N}$, U, Cu, Na, Al, Zn y Ce), y el 99,2 % de las muestras de agua, con sólo 5 variables ($^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, Mg, Li, Ba y Na). Con esto se logró tener un perfil elemental e isotópico característico de cada región.

El estudio elemental e isotópico en muestras de trigo también mostró un perfil característico para cada región estudiada. La aplicación de técnicas estadísticas multivariadas (AC, ACP y ADS) permitió la discriminación geográfica del 100 % de las muestras de trigo, siendo las variables más importantes para esta discriminación K/Rb, Ca/Sr, Ba, $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, Co, Mo, Zn, Mn, Eu, $\delta^{13}\text{C}$ y Na.

Las variables Ba, Na y la relación $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, fueron importantes para discriminar muestras de suelo, agua y trigo. Estas variables, además de $\delta^{13}\text{C}$, Mn, Ca/Sr y Mg, que también sirvieron para discriminar muestras de vino (Di Paola-Naranjo *et al.*, 2011) y carne (Baroni *et al.*, 2011) de Argentina, serían las más importantes para determinar el origen de los alimentos entre las regiones estudiadas.

Finalmente, hasta donde se conoce, este fue el primer trabajo que demostró la correspondencia entre suelo, agua y trigo por métodos estadísticos multivariados. A través del APG (consenso del 99,2 %) y el ACC, se observó una correlación entre muestras de trigo con suelos ($r^2 = 0,97$, $p < 0,001$) y de trigo con aguas ($r^2 = 0,96$, $p < 0,001$) procedentes de las mismas áreas de producción, evidenciando una absorción de minerales del suelo y el agua por el trigo.



CAPÍTULO 2

***PERFIL DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS
EN TRIGO DE DISTINTO GENOTIPO Y
PROCEDENCIA.***

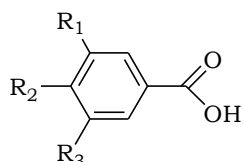
2.1. INTRODUCCIÓN.

El trigo es el cereal mayoritario en la dieta humana y es ampliamente consumido en todo el mundo. Además de satisfacer las necesidades calóricas de la población, estudios epidemiológicos sugieren que el consumo regular de trigo integral puede reducir la incidencia de enfermedades cardiovasculares, diabetes de tipo 2 y cáncer de colon (Verma *et al.*, 2009).

Algunos trabajos que intentaron identificar los compuestos responsables de este efecto beneficioso, sugirieron que puede ser atribuido a la acción sinérgica de varios compuestos dentro del grano, especialmente aquellos presentes en el salvado y en el germen del trigo, como las fibras alimentarias y algunos fitoquímicos, como vitaminas, minerales, carotenoides, flavonoides, ácidos fenólicos, entre otros (Sang *et al.*, 2006). La fibra alimentaria mejora la salud intestinal, mientras que las propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias de la mayoría de los fitoquímicos pueden ayudar a prevenir el cáncer y las enfermedades cardiovasculares (Fardet, 2010). Sin embargo, los mecanismos fisiológicos exactos en los que estos compuestos están involucrados aún están lejos de ser dilucidado.

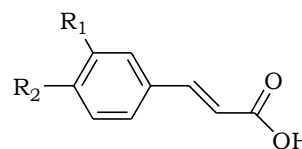
Dentro de los fitoquímicos encontrados en el grano de trigo, destacan los ácidos fenólicos y los flavonoides. Los **ácidos fenólicos** son compuestos derivados de ácido benzoico y ácido cinámico. Se clasifican de acuerdo a estos en ácidos hidroxibenzoicos (AHB) y ácidos hidroxicinámicos (AHC), y la estructura química básica de cada uno de ellos es C₆-C₁ y C₆-C₃, respectivamente (**Figura 2.1**).

Ácidos hidroxibenzoicos



$R_1 = R_3 = OH, R_2 = H$: Ácido 2,4-dihidroxibenzoico
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Ácido gálico

Ácidos hidroxicinámicos



$R_1 = OH$: Ácido cumárico
 $R_1 = R_2 = OH$: Ácido cafeico
 $R_1 = OCH_3, R_2 = OH$: Ácido ferúlico

Figura 2.1. Estructura química de ácidos fenólicos. Adaptado de Manach *et al.* (2004).

Los ácidos fenólicos se producen en la planta a través de la vía del ácido shiquímico, a partir de aminoácidos aromáticos como la fenilalanina y el triptófano (Bondia-Pons *et al.*, 2009) y, aunque aún no ha sido elucidado completamente su mecanismo de acción en el organismo humano, se cree que actúan mayoritariamente como atrapadores de radicales libres (Augustin Scalbert & Williamson, 2000), especialmente de especies reactivas de

oxígeno (EROs). Su mecanismo de acción está probablemente ligado a la activación/represión de genes particulares que están implicados en la respuesta antioxidante del organismo (Lee *et al.*, 2003; Na & Surh, 2006).

Los **flavonoides** presentan una estructura química común, el difenilpropano (C₆-C₃-C₆), la cual consiste en 2 anillos aromáticos (A y B) unidos por 3 átomos de carbono que forman un heterociclo oxigenado (anillo C) (**Figura 2.2**).

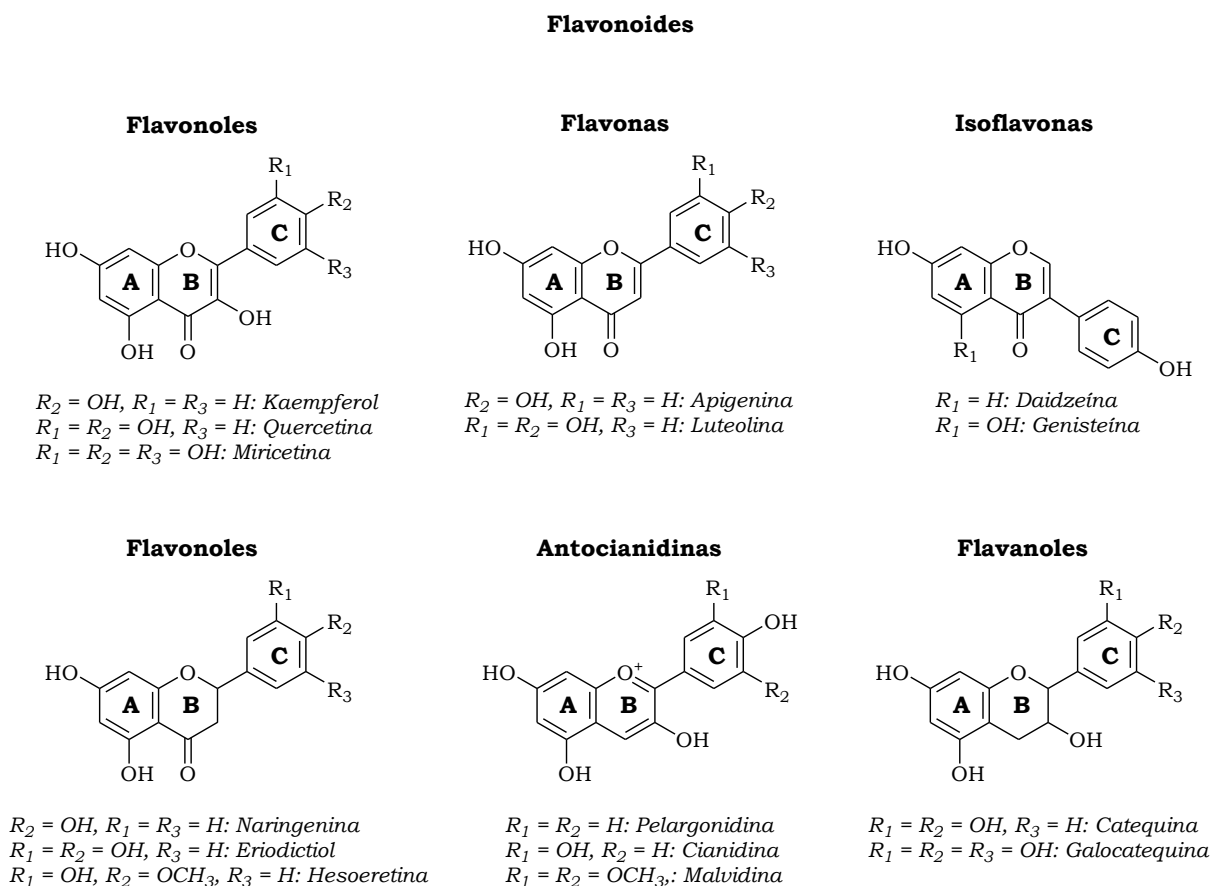


Figura 2.2. Estructura química de flavonoides. Adaptado de Manach *et al.* (2004).

Estos compuestos pueden ser divididos en 6 subclases en función del heterociclo involucrado: flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas y flavanoles (catequinas y proantocianidinas).

Las propiedades antioxidantes de este grupo de compuesto las confieren los grupos hidroxilos unidos a los anillos aromáticos. Estos grupos pueden actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno, atrapadores de radicales libres e incluso como quelantes de metales. Además activan enzimas antioxidantes, reducen los radicales de α -tocoferol, inhiben oxidasas, atenúan estrés nitrosativo y aumentan los niveles de ácido úrico y de moléculas de bajo peso molecular (Procházková *et al.*, 2011; Rice-Evans *et al.*, 1996).

La mayoría de los polifenoles presentes en el trigo (aproximadamente el 90 %), principalmente los derivados de ácidos hidroxicinámicos, son insolubles o se encuentran unidos a macromoléculas de la pared celular, como arabinosilanos y lignina, a través de uniones éster o éter, entrelazándolos (intra y/o intermolecularmente) hasta formar una red (**Figura 2.3**) (Adom *et al.*, 2003; Liyana-Pathirana & Shahidi, 2006), mientras que una pequeña proporción está presente como compuestos libres o solubles, dentro de las vacuolas celulares, o como glicósidos (Stalikas, 2007).

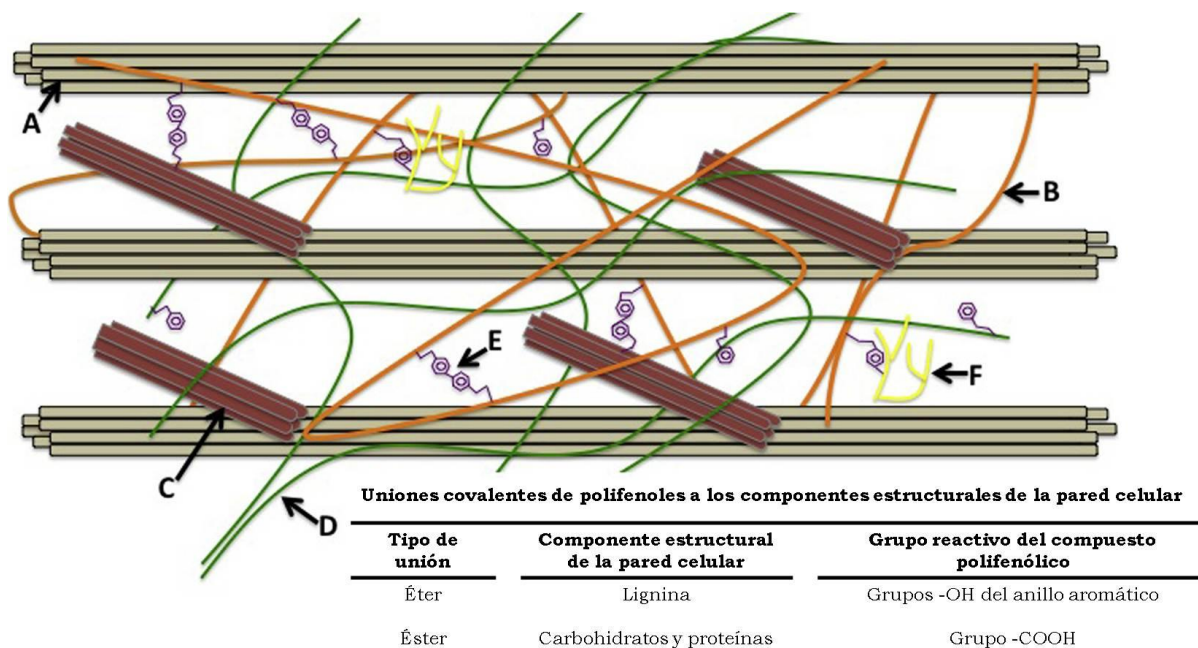


Figura 2.3. Representación de la estructura primaria de la pared celular de material vegetal y uniones entre componentes estructurales y compuestos fenólicos. A representa celulosa; B es hemicelulosa; C son proteínas estructurales; D es pectina; E son ácidos fenólicos y F son ligninas. Adaptado de (Acosta-Estrada *et al.*, 2014).

La distribución de estos compuestos polifenólicos dentro del grano de trigo no es uniforme, sino que la mayor proporción de ellos se encuentra en las capas exteriores (capa de aleurona, testa, y pericarpio) que conforman el salvado del trigo (Hemery *et al.*, 2010). Por este motivo, en la actualidad se busca aumentar la producción y el consumo de productos elaborados con cereales integrales.

Adicionalmente, el tipo y contenido de polifenoles en el trigo también depende de otros factores, entre los que encontramos la variedad, las condiciones climáticas y las prácticas de cultivo, entre otros (Hernández *et al.*, 2011). Por lo que, el efecto beneficioso en la salud humana impartido por estos compuestos puede ser el resultado de asociaciones aditivas, sinérgicas o antagónicas entre estos compuestos.

El presente trabajo busca caracterizar y cuantificar los compuestos polifenólicos presentes en distintas variedades argentinas de trigo, procedentes de regiones argentinas diferentes. Esto apunta a mejorar el conocimiento de las cualidades nutricionales del trigo argentino, identificando las variedades con mayor contenido en compuestos polifenólicos. Los hallazgos promoverían el estudio a futuro de la base genética de los caracteres asociados a la generación de estos compuestos, para desarrollar estrategias de selección en los programas de mejoramiento genético.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.

El estudio de las propiedades antioxidantes de trigos se enmarcó dentro de la Red de Ensayos Comparativos de Cultivares de Trigo Pan de Argentina (**RET**) coordinada por el Instituto Nacional de Semillas (**INASE**) y dependiente de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación de la Nación (**SAGPyA**). Esta red analiza anualmente los parámetros productivos y de calidad panadera de las variedades de trigo que participan de dicho ensayo, por cada sub-región agrícola y por localidad que integra cada subregión.

En esta tesis buscamos ampliar la información aportada por la **RET** a través de la caracterización de las distintas variedades de trigo en relación a sus propiedades antioxidantes.

2.2.1. Estándares y reactivos.

Se utilizaron estándares comerciales de ácido *trans*-ferúlico y ácido cafeico obtenidos de Extrasynthèse (Genay, Francia), ácido *p*-cumárico provisto por Fluka (Dorset, Reino Unido) y catequina, apigenina y triptófano de Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania).

Para la extracción de polifenoles se utilizó acetona Anedra, éter etílico y acetato de etilo BioPack, hidróxido de sodio Cicarelli y ácido clorhídrico J.T. Baker.

Para la determinación de polifenoles totales se utilizó el reactivo de Folin-Ciocalteu de Sigma Aldrich (Suiza).

En la determinación del perfil de polifenoles el metanol utilizado como fase móvil y para reconstituir los extractos fue de grado HPLC marca J. T. Baker (México) y el ácido fórmico p.a. para espectroscopía de masas fue de Fluka (Steinheim, Alemania). Para filtrar los extractos antes de la inyección se utilizaron filtros de 0,45 µm (HVLP04700) de Millipore (São Paulo, Brasil).

El agua utilizada para las extracciones y determinaciones fue ultra pura (menos de 5 µg/L de TOC) obtenida de un sistema de purificación Arium 61316-RO acoplado a un sistema Arium 611-UV (Sartorius, Alemania).

2.2.2. Muestreo.

Se estudiaron 12 variedades de trigo (*Triticum aestivum*) procedentes de distintas firmas comerciales, con distintas variaciones genéticas: **ACA 303**, **ACA 315**, **ACA 320** y **ACA 903 B** de ASOCIACIÓN de COOPERATIVAS ARGENTINAS (ACA), **BUCK 75 ANIVERSARIO** de BUCK SEMILLAS S. A., **Cronox** Asociados Don Mario S. A., **BIOINTA 3004** de BIOCERES (INTA), **BAGUETTE PREMIUM 11** de Nidera S. A., **LE 2330** de

SURSEM S. A., **KLEIN CAPRICORNIO**, **KLEIN GUERRERO** y **KLEIN YARARÁ** de Criadero Klein S. A.

El muestreo fue realizado por personal del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (**INTA**) según protocolos previamente establecidos por la entidad. La recolección de las semillas se realizó durante 2 años de producción (2009 y 2010) en 4 zonas delimitadas por el INTA: **SUB I** (Reconquista), **SUB IIN** (Marcos Juárez y Pergamino), **SUB IV** (Balcarce y Barrow) y **SUB VN** (Jesús María y Manfredi) (**Figura 2.4**).

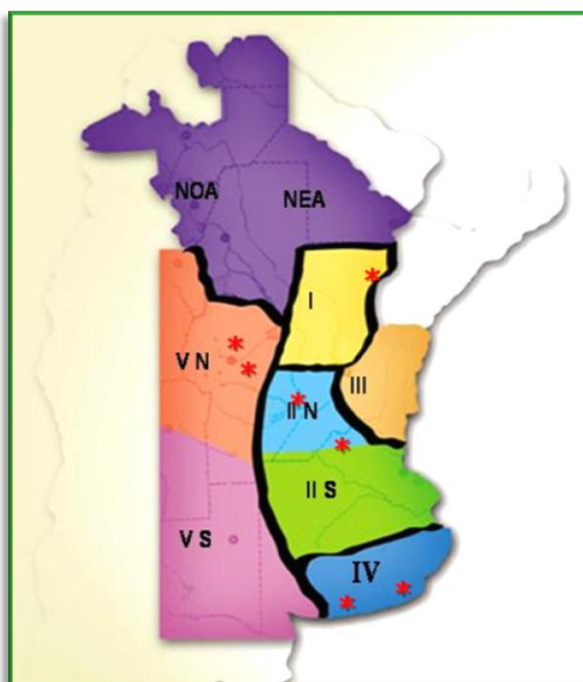


Figura 2.4. Delimitación de las zonas de muestreo. Las localidades donde fueron tomadas las muestras se indican con asterisco rojo.

En total se estudiaron 146 muestras: 16 de ACA 303, 17 de ACA 315, 15 de ACA 320, 13 de ACA 903 B, 11 de BAGUETTE PREMIUM 11, 14 de BIOINTA 3004, 15 de BUCK 75 ANIVERSARIO, 8 de CRONOX, 7 de KLEIN CAPRICORNIO, 9 de KLEIN GUERRERO, 8 de KLEIN YARARÁ y 13 de LE 2330 distribuidas en las 4 zonas muestreadas.

El traslado de las muestras al laboratorio se realizó en bolsas plásticas perfectamente rotuladas. Una vez recibidas, se fraccionaron en potes plásticos previamente lavados con HNO_3 al 10%, para evitar contaminación orgánica, y almacenadas a -20°C hasta su análisis.

2.2.3. Extracción de polifenoles.

La extracción de los compuestos polifenólicos presentes en las muestras de trigo se realizó en 2 etapas, la primera para extraer los compuestos libres en la matriz del grano y la segunda para extraer aquellos que se encontraban unidos a la pared celular, obteniendo así 2 fracciones por cada muestra.

Antes de las extracciones, las muestras se secaron a 35°C en una estufa por 3 días. Luego se molieron en un molinillo de café hasta generar la harina integral y posteriormente se tomaron 10 g de esta harina y se secaron nuevamente en estufa a 35°C por 60 horas antes de proceder con las extracciones.

2.2.3.1. Extracción de polifenoles libres (Fracción Libre).

En un erlenmeyer de 100 mL se colocaron 5,0 g de muestra y se agregaron 20 mL de una mezcla fría de Acetona/Agua (4:1) mezclando hasta homogeneización. Luego, para extraer los polifenoles libres se agitó el contenido del erlenmeyer en un agitador de KLINE (VICKING) a 130-150 rpm por 1 h a 25°C en oscuridad. Posteriormente se separó el sobrenadante, se filtró con papel de filtro de celulosa y se trasvasó a una botella de 100 mL color caramelo. Este mismo procedimiento se repitió 2 veces más juntando los sobrenadantes obtenidos. Finalmente, se evaporó el solvente del sobrenadante hasta sequedad y se reconstituyó el extracto con 5 mL de metanol de grado HPLC. La fracción libre (FL) de polifenoles obtenida se conservó a -80°C hasta el momento de su análisis.

2.2.3.2. Extracción de polifenoles unidos (Fracción Unida).

El residuo sólido obtenido después de la extracción de los compuestos fenólicos libres se secó en estufa a 35°C por 2 h. Luego, se agregaron 20 mL de NaOH 2M (hidrólisis básica) para romper uniones éster y éter, y se agitó a 250-300 rpm por 15 h a 25°C en oscuridad. Después de la hidrólisis básica, la muestra se acidificó con 4 mL de HCl concentrado, alcanzando un pH menor a 2 para precipitar ligninas, y se agitó por 90 segundos hasta su completa homogenización. Posteriormente, la muestra se trasvasó a un tubo para centrifuga y se centrifugó en ultra centrifuga (Beckman Coulter modelo Avanti J-25) a 12.000 rpm por 20 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se colocó en un erlenmeyer de 100 mL, donde la extracción de los compuestos fenolicos unidos se realizó con 15 mL de una mezcla fría de éter etílico/acetato de etilo (1:1) con 1 min de agitación. El contenido del erlenmeyer se colocó en otro tubo para centrifuga, centrifugando la muestra a 6.000 rpm por 15 min a temperatura ambiente (centrifuga Eppendorf 5804). La extracción con acetato de etilo/éter etílico se repitió 2 veces más, y los extractos orgánicos obtenidos se juntaron en una botella color caramelo de 100 mL. Finalmente, se evaporó el solvente del sobrenadante hasta sequedad y se reconstituyó el extracto con 5 mL de metanol de grado HPLC. La

fracción unida (FU) de polifenoles obtenida se conservó a -80°C hasta el momento de su medición.

2.2.4. Determinación de compuestos polifenólicos.

2.2.4.1. Contenido de polifenoles totales - Técnica de Folin Ciocalteu.

El método de Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton & Rossi (1965), ha sido utilizado durante muchos años como una medida del contenido en compuestos fenólicos de productos naturales. El mecanismo básico del ensayo es una reacción redox. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico que actúan como oxidantes, y se reducen en presencia de compuestos fenólicos presentes en las distintas muestras a ensayar. La transferencia de electrones a pH básico reduce estos ácidos a óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}) de color azul intenso que tienen un máximo de absorbancia a 750 nm.

↳ Procedimiento.

Para la determinación de las muestras se colocaron 1.680 μL de agua ultrapura y 100 μL de metanol en un tubo de Khan, se añadieron 10 μL del extracto obtenido (**Sección 2.2.3.1 y 2.2.3.2**) y luego se agregaron 100 μL del Reactivo de Folin Ciocalteu. La mezcla obtenida se agitó por 1 min en un vortex (Fbr Decalab S.R.L). Inmediatamente después, se agregaron 300 μL de Na_2CO_3 al 20 % p/v, se agitó y se dejó reposar a temperatura ambiente por 120 min. Finalmente se midió la absorbancia de la solución a 750 nm contra un blanco procesado de la misma forma, en el cual la muestra fue reemplazada por el solvente de dilución. Todas las muestras y los blancos fueron ensayados por triplicado.

Para calcular el contenido de polifenoles totales (PT) en las muestras, se construyó una curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar. El rango de linealidad utilizado fue de 0 a 5,05 mg de ácido gálico/L y los estándares se procesaron por triplicado de la misma forma que las muestras.

Los resultados obtenidos se expresaron como miligramos de polifenoles equivalentes al ácido gálico en 100 g de muestra seca (mg EAG/100g).

2.2.4.2. Determinación del perfil de polifenoles por HPLC-DAD-ESI-QTOF.

El perfil de compuestos fenólicos en los extractos libres y unidos se analizó utilizando el método de HPLC-DAD-ESI-MS/MS.

El sistema de HPLC utilizado consistió en un HPLC Agilent Technologies Serie 1200, equipado con una bomba de gradiente binario Agilent G1312B SL, un desgasificador de solventes Agilent G1379 B y un inyector automático Agilent G1367 D SL+WP.

La separación cromatográfica se realizó en una columna LUNA (Phenomenex, Torrance, CA, Estados Unidos) de fase reversa C18 (5 μm , 250 mm \times 4,60 mm de diámetro interno) a 35°C utilizando el módulo de calentamiento Agilent G1316 B. El gradiente de fase móvil necesario para la separación cromatográfica se realizó empleando ácido fórmico al 0,5 % v/v en agua como solvente A, y ácido fórmico al 0,5 % v/v de metanol como solvente B, según se muestra en la **Tabla 2.1**.

Tabla 2.1. Gradiente cromatográfico utilizado para la separación de compuestos polifenólicos.

Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	80	20
3	50	50
8	50	50
15	30	70
20	30	70
21	20	80
30	20	80
31	80	20
41	80	20

El flujo utilizado de la fase móvil para la separación cromatográfica fue de 0,4 mL/min y el volumen de inyección de la muestra fue de 40 μL .

El sistema de HPLC se acopló a un detector con arreglo de diodos (PDA) Agilent G1315 C Starlight DAD seguido de un espectrómetro de masas QTOF (microTOF Serie QII de Bruker) equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI).

Los espectros UV-VIS se registraron entre 200 y 600 nm. Los espectros de masas se registraron en modo negativo en un intervalo de 50 a 1500 m/z. Las condiciones de trabajo de la fuente de ionización ESI fueron las siguientes: voltaje del capilar, 4500 V; presión del gas de nebulización, 4,0 bar; flujo del gas de secado, 8,0 L/min y temperatura del gas de secado, 180°C. Como gas de nebulización se utilizó N_2 , mientras que el gas de colisión fue Ar. El detector de masas se programó para realizar un barrido de MS/MS de los 3 iones más abundantes, utilizando una energía de colisión de 13,0 eV.

La adquisición de datos se realizó utilizando el programa Compass Versión 3.1 y el procesamiento de los mismos se llevó a cabo con el programa DataAnalysis Versión 4.0 (Bruker Daltonics, Estados Unidos).

La optimización del método de análisis se realizó utilizando estándares comerciales representando a distintas familias de compuestos fenólicos. Todas las muestras y estándares se filtraron a través de membranas de 0,45 μm de poro antes de su inyección.

Los compuestos polifenólicos presentes en los extractos de trigo se identificaron y caracterizaron de acuerdo a sus tiempos de retención, espectros UV-VIS, masa exacta, espectros de MS y MS/MS, como así también por la comparación con estándares auténticos cuando estos estaban disponibles y con compuestos reportados en la literatura.

La cuantificación de los compuestos encontrados en los extractos se realizó con curvas de calibración externas de estándares polifenólicos disponible, usando el área del pico de masas obtenida del cromatograma base del ión extraído. Para esto, se prepararon soluciones multi-componentes de distintas concentraciones conteniendo ácido gálico, catequina, ácido cafeico, ácido *trans*-ferúlico, apigenina y triptófano. El rango de concentración utilizado para cada compuesto se muestra en la **Tabla 2.2**.

Tabla 2.2. Rango lineal de los estándares utilizados para la cuantificación de los compuestos encontrados en los extractos de trigo.

Compuesto	Rango lineal
ácido gálico	0,1-60,0 mg/L
catequina	0,1-5,0 mg/L
ácido cafeico	0,1-30,0 mg/L
ácido ferúlico	0,1-400,0 mg/L
apigenina	0,1-5,0 mg/L
triptófano	0,1-60,0 mg/L

Cuando no estaba disponible el estándar del compuesto identificado, la cuantificación se realizó utilizando un estándar con estructura similar al compuesto en cuestión. Todos los estándares se inyectaron por triplicado y los resultados obtenidos se expresaron como miligramos de estándar equivalente en 100 g de muestra seca (mg / 100g).

2.2.5. Tratamiento estadístico de los datos.

El programa utilizado para la interpretación de los resultados generados en esta parte de la tesis fue el paquete **InfoStat** (Di Rienzo *et al.*, 2008).

Se utilizó el análisis de la varianza para comparar los resultados obtenidos de polifenoles en las distintas variedades de trigo analizadas, como así también para las variaciones climáticas (zona y año de cultivo), utilizando el mismo procedimiento que se describió en el **Capítulo 1, Sección 1.2.6**.

Para discriminar entre distintas variedades de trigo se utilizó el análisis de componentes principales (ACP) (**Anexo I, Sección 1.3.1** y **Capítulo 1, Sección 1.2.6**).

2.3. DESCRIPCIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

La extracción de los compuestos polifenólicos presentes en todas las muestras de trigo se realizó en 2 etapas, la primera para extraer los compuestos libres en la matriz del grano y la segunda para extraer aquellos que se encontraban unidos a la pared celular, obteniendo así 2 extractos por cada muestra. Tanto la fracción libre (FL) como la fracción unida (FU) de polifenoles fueron analizadas por separado. En cada una de ellas se midieron el contenido total de polifenoles, a través de método de Folin Ciocalteu (PT), y el perfil de polifenoles a través de la técnica HPLC-DAD-ESI-MS/MS.

2.3.1. Contenido de polifenoles totales (PT).

En la **Figura 2.5** se muestra el contenido de PT de la FL y la FU de cada una de las variedades de trigo estudiadas. También se muestra el contenido de PT de la suma de estas dos fracciones (FL + FU), la cual se identifica como FT. Los resultados se expresan en mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de peso seco de grano entero.

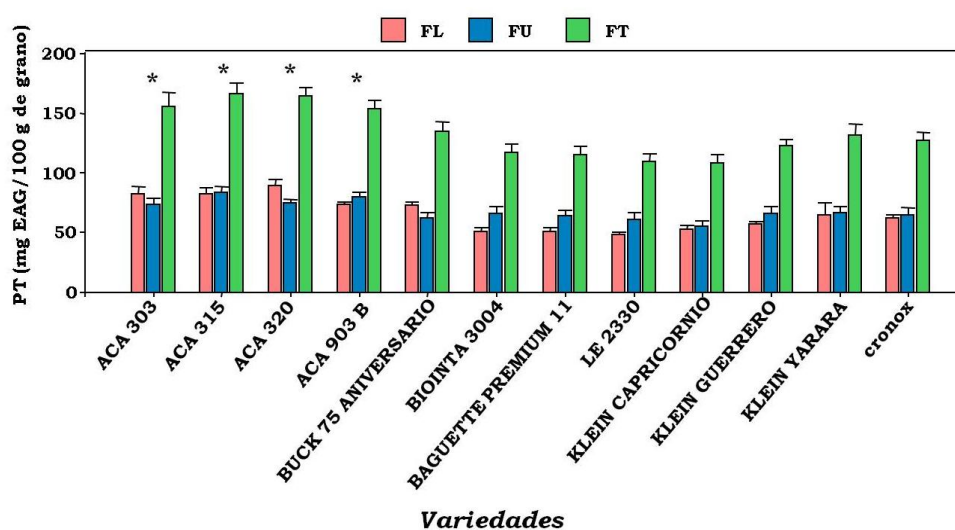


Figura 2.5. Contenido de polifenoles totales en la fracción libre, unida, y libre + unida, de cada una de las variedades de trigo estudiadas. * indica diferencia significativa ($p < 0,05$) en PT con respecto al resto.

El contenido de PT en la FL varió de 90 ± 18 mg EAG/100 g en la variedad ACA 320 a 48 ± 8 mg EAG/100 g en la variedad LE 2330. Por otro lado en la FU el contenido de PT varió de 84 ± 18 mg EAG/100 g en ACA 315 a 55 ± 11 mg EAG/100 g en la variedad Klein

Capricornio. En cuanto a la FT de PT (FL + FU), este varió de 170 ± 40 mg EAG/100 g en la variedad ACA 315 a 108 ± 17 mg EAG/100 g en la variedad Klein Capricornio.

Las variedades ACA 303, ACA 315, ACA 320 y ACA 903 B, mostraron los valores significativamente ($p < 0,05$) más altos de PT en la FL, en la FU y en la FT. Estas variedades podrían exhibir mejores propiedades antioxidantes que el resto de las variedades, las cuales no mostraron diferencias significativas entre sí.

Los valores de PT obtenidos en este trabajo presentan el mismo orden de magnitud que los datos reportados en la literatura. Heimler *et al.* (2010) reportaron valores entre 70 y 122 mg EAG/100 g en la FL de extractos de diferentes variedades de trigo procedentes de Italia, mientras que Liu *et al.* (2010) encontraron valores entre 77 y 177 mg equivalentes de ácido ferúlico (EAF)/100 g en la FL de extractos de distintas variedades de trigo de Dinamarca. Por otro lado Verma *et al.*, (2009) reportaron valores entre 107,8 y 282,6 mg EAF/100 g en la FU de extractos de 6 variedades diferentes de trigo procedentes de Canadá, mientras que Liyana-Pathirana & Shahidi (2006) mostraron un valor promedio de 214 mg EAF/100 g en la FU de extractos de dos variedades Canadienses de trigo.

Con respecto a otros cereales, el trigo demostró mayor contenido de polifenoles totales (131 ± 6 mg EAG/100g de muestra como FT) que avena (107 ± 3 mg EAG/100g de muestra) y arroz (91 ± 3 mg EAG/100g de muestra), y valores significativamente menores a los encontrados para maíz (255 ± 10 mg EAG/100g de muestra) (Adom & Liu, 2002). En la **Figura 2.6** se muestra que el contenido total de polifenoles (FT) en trigo es incluso comparable a algunas frutas y vegetales.

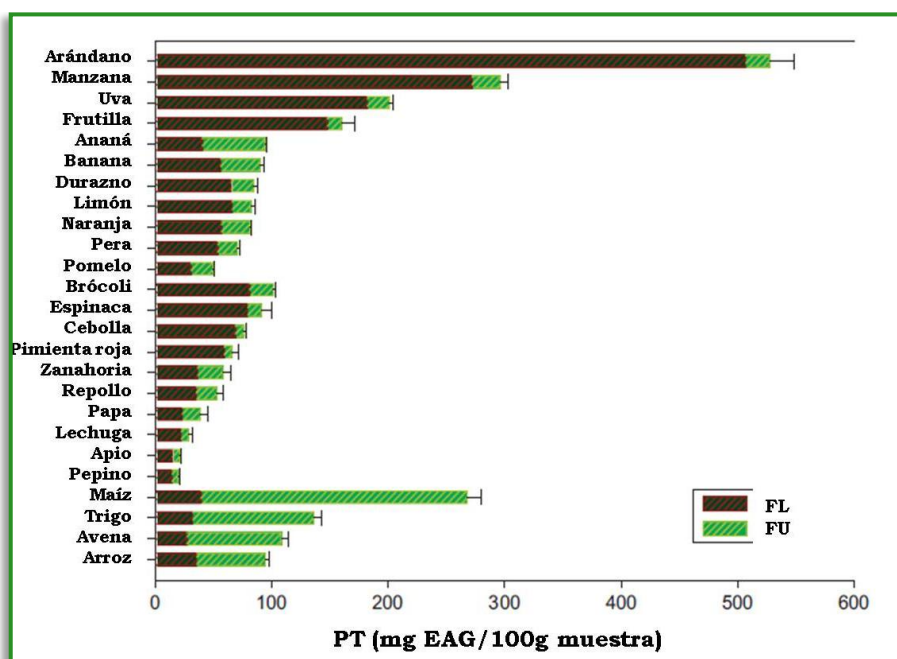


Figura 2.6 Contenido de polifenoles totales de frutas, vegetales y granos enteros. Adaptada de Liu (2007).

Adicionalmente, la FL de los polifenoles presentes en el grano de trigo entero representó, en promedio, el 49 % del contenido de PT en la FT (FL + FU), mientras que la FU representó el 51 % de estos. Estos resultados difieren de lo reportado por otros autores, Hung *et al.* (2009), mostraron que la cantidad de compuestos polifenólicos presentes en la FU de grano de trigo entero representaban el 70 % del contenido total de polifenoles en la FT, mientras que los compuestos presentes en la FL representaban el 30 % restante. Ellos también determinaron que la relación de polifenoles en la FL versus la FU disminuía del endospermo al salvado del trigo, por lo que, los compuestos polifenólicos unidos se asociaron principalmente al salvado de trigo, mientras que los polifenoles presentes en FL se asociaron más al endospermo del grano. Estos mismos resultados fueron informados por Adom & Liu (2002), quienes determinaron que la fracción unida de polifenoles en muestras de trigo, representaban el 75 % de los polifenoles totales encontrados en ellas. Estas diferencias probablemente se deban a los distintos métodos de extracción empleados. En este trabajo la FL se extrajo con una mezcla de acetona/agua (8:2), mientras que los autores antes mencionados realizaron la extracción de la FL con etanol/agua (8:2).

El contenido de polifenoles totales brinda una idea general sobre qué variedades podrían llegar a tener mejores propiedades antioxidantes. Sin embargo, para establecer verdaderas diferencias entre variedades, es necesario determinar el perfil de compuestos polifenólicos presente en cada una de ellas.

2.3.2. Caracterización del perfil de polifenoles por HPLC-DAD-ESI-QTOF.

Para la caracterización del perfil de polifenoles se utilizó la metodología descrita anteriormente (**Sección 2.2.4.2**). La identificación en cada fracción (FL y FU) se realizó utilizando mezclas (“pools”) de muestras. En la **Figura 2.7** se muestran los cromatogramas del pico base (CPB) para cada una de las fracciones analizadas.

En la FL se identificaron 10 compuestos polifenólicos y un aminoácido, mientras que en la FU se lograron identificar 14 compuestos polifenólicos, la mayoría derivados de ácido ferúlico.

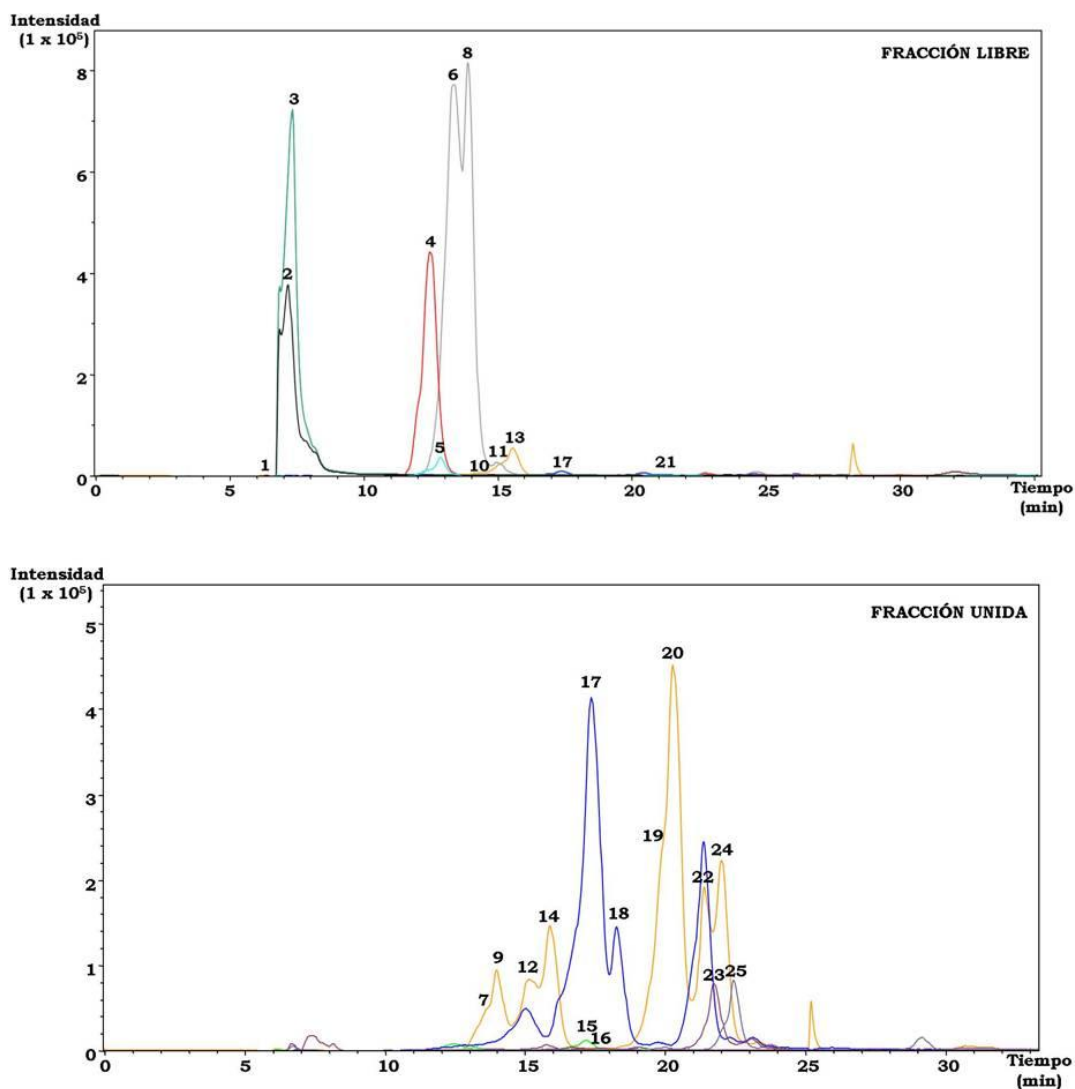


Figura 2.7. Cromatogramas del pico base de la FL (arriba) y la FU (abajo). Los números en el cromatograma representan los distintos compuestos identificados.

La identificación y caracterización de los compuestos polifenólicos encontrados en cada fracción se realizó de acuerdo a sus masas exactas, tiempos de retención, espectros UV-VIS, espectros de MS y espectros MS/MS. También se utilizaron estándares auténticos (ácido cumárico, ácido *trans*-ferúlico y triptófano) y se realizaron comparaciones con compuestos reportados en la literatura. En la **Tabla 2.3** se enumeran los 25 compuestos identificados con sus fórmulas moleculares, tiempos de retención, iones precursores de m/z experimentales y calculadas, errores (ppm) y fragmentos de MSMS.

Tabla 2.3. Identificación de compuestos polifenólicos. Características cromatográficas y moleculares de cada compuesto identificado.

N°	Nombre del compuesto ^a	Fórmula molecular	TR ^b (min)	[M-H] ⁻ (m/z) exp. ^c	[M-H] ⁻ (m/z) cal. ^d	error ppm	patrón de fragmentación (intensidad relativa %)	λ _{máx} (nm) ^e	Fr. ^f
1	ác. 2-hidroxi-3-O-β-D-glucopiranosilbenzoico	C ₁₃ H ₁₅ O ₉	6,4	315,072	315,072	0,6	271 (100)	279	FL
2	diglucósido de ácido hidroxibenzoico	C ₂₄ H ₂₇ O ₁₄	7,2	539,143	539,141	5,0	503 (100); 539 (94); 377 (32)	279	FL
3	glucósido de ácido hidroxibenzoico	C ₁₈ H ₁₇ O ₉	7,4	377,088	377,088	1,6	341 (100); 215 (16)	279	FL
4	triptófano	C ₁₁ H ₁₁ N ₂ O ₂	12,5	203,083	203,083	2,0	203 (100); 186 (51)	276	FL
5	crisoeriol-6,8-di-C-pentósido	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₅	12,9	579,135	579,136	-0,3	579 (100); 459 (19); 489 (16); 399 (13)	272, 329	FL
6	8-C-glucosil-6-C-arabinosil-apigenina	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₄	13,3	563,142	563,141	2,8	563 (100); 203 (7); 443 (4); 353 (3.5)	271; 330	FL
7	ác. diferúlico (isómero 1)	C ₂₀ H ₁₇ O ₈	13,6	385,092	385,093	-1,6	341 (100); 282 (34); 326 (25); 193 (16); 297 (9); 267 (5)	277; h 315	FU
8	6-C-glucosil-8-C-arabinosil-apigenina	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₄	13,9	563,143	563,141	3,6	563 (100); 443 (5); 473 (4); 353 (3)	271 ; 331	FL
9	ác. diferúlico (isómero 2)	C ₂₀ H ₁₇ O ₈	14,0	385,092	385,093	-2,1	341 (100); 282 (24); 326 (23); 297 (18); 193 (8)	278; h 314	FU
10	ác. diferúlico (isómero 3)	C ₂₀ H ₁₇ O ₈	14,2	385,100	385,093	18,4 *	341 (100); 267 (90); 221 (51); 203 (30); 293 (23); 249 (18)	325; h 270	FL
11	ác. diferúlico (isómero 4)	C ₂₀ H ₁₇ O ₈	15,1	385,100	385,093	18,4 *	267 (100); 351 (79); 341 (74); 249 (52); 221 (32)	316; h 277	FL
12	ác. diferúlico (isómero 5)	C ₂₀ H ₁₇ O ₈	15,1	385,093	385,093	-1,0	297 (100); 282 (97); 341 (72); 193 (71); 326 (49); 267 (42)	318; h 292	FU
13	ác. diferúlico (isómero 6)	C ₂₀ H ₁₇ O ₈	15,5	385,100	385,093	18,4 *	267 (100); 249 (40); 221 (20); 341 (20)	279; h 309	FL
14	ác. diferúlico (isómero 7)	C ₂₀ H ₁₇ O ₈	15,9	385,093	385,093	-0,3	297 (100); 341 (76); 282 (65); 326 (36); 267 (23)	320; h 296	FU
15	ác. cumárico	C ₉ H ₇ O ₃	17,1	163,041	163,040	3,7	-	-	FU
16	derivado de ác. ferúlico	C ₂₂ H ₁₇ O ₈	17,3	409,091	409,093	-4,6	193 (100); 178 (8)	322; h 298	FU
17	ác. <i>trans</i> -ferúlico	C ₁₀ H ₉ O ₄	17,3	193,051	193,051	2,6	178 (100)	320; h 298	FL y FU
18	ác. <i>cis</i> -ferúlico	C ₁₀ H ₉ O ₄	18,2	193,050	193,051	-1,6	178 (100)	318; h 295	FU
19	ác. diferúlico (isómero 8)	C ₂₀ H ₁₇ O ₈	19,9	385,094	385,093	1,8	385 (100); 341 (38); 326 (19); 282 (19); 370 (11)	322; h 302	FU
20	ác. diferúlico (isómero 9)	C ₂₀ H ₁₇ O ₈	20,3	385,094	385,093	3,4	385 (100); 341 (40); 282 (17); 326 (16); 370 (10)	321; h 303	FU
21	<i>p</i> -coumaroil-feruloilputrescina	C ₂₃ H ₂₅ N ₂ O ₅	21,1	409,176	409,176	-0,9	289 (100); 259 (88)	321; h 285	FL
22	ác. diferúlico (isómero 10)	C ₂₀ H ₁₇ O ₈	21,4	385,094	385,093	2,1	193 (100); 178 (17); 341 (11); 326 (8); 282 (6); 298 (5); 267 (3)	323; h 298	FU
23	ác. triferúlico	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂	21,7	577,136	577,135	0,9	385 (100); 341 (95); 193 (37)	310	FU
24	ác. diferúlico (isómero 11)	C ₂₀ H ₁₇ O ₈	22,0	385,094	385,093	3,4	341 (100); 326 (91); 282 (69); 297 (44); 267 (30); 193 (15)	308	FU
25	ác. diferúlico (isómero 12)	C ₂₁ H ₁₉ O ₇	22,4	383,114	383,114	1,3	193 (75); 341 (56); 282 (25); 368 (20)	315; h 292	FU

^aác. abreviatura de ácido; ^b tiempo de retención; ^c experimental; ^d calculada; ^e longitud de onda máxima, h es hombro; ^f fracción L o U; * errores altos debido a la baja intensidad del compuesto.

Los compuestos fueron enumerados según el orden de elución. Se identificaron 3 compuestos derivados de ácidos hidroxibenzoicos (AHB), 3 flavonas (FVA), 18 derivados de ácidos hidroxicinámicos (AHC) y 1 aminoácido (aa).

El aminoácido identificado (pico **4**) presentó la fórmula molecular $C_{11}H_{11}N_2O_2$ y el ion precursor de m/z 203,0830, correspondientes al triptófano, el cual fue identificado por comparación de su TR y espectros de UV y MS con el estándar comercial. Este aminoácido se encontró principalmente en la FL de los extractos de trigo. Si bien no es un compuesto polifenólico, se ha incluido en los estudios de las propiedades antioxidantes de las muestras de trigo, debido a que presenta capacidad antioxidante, incluso mayor a algunos AHC, cuando se mide a través del método TEAC, lo que concuerda con lo expuesto por Bauer *et al.* (2012). Además de esta capacidad antioxidante, el triptófano reacciona con el reactivo de Folin Ciocalteu aportando al valor obtenido de polifenoles totales (Verma *et al.*, 2009).

2.3.2.1. Derivados de ácidos hidroxibenzoicos.

Los tres compuestos derivados de AHB fueron identificados solamente en la FL de los extractos de trigo estudiados.

El primer compuesto (**1**) identificado dentro de este grupo fue el ion de m/z igual a 315,072, cuya fórmula molecular fue $C_{13}H_{15}O_9$. Este compuesto presentó un espectro UV característico de AHB con un máximo de absorción a 279 nm correspondiente al grupo benzoil (Abad-García *et al.*, 2009), y un fragmento de m/z 271,08 generado por la pérdida de una molécula de CO_2 , común en los AHB (Abad-García *et al.*, 2009). De acuerdo a Verardo *et al.* (2010) este ion precursor corresponde al ác. 2-hidroxi-3-O- β -D-glucopiranosilbenzoico, el cual fue identificado en extractos etanólicos de harina de trigo integral.

Los compuestos **2** y **3** también muestran espectros UV característicos de AHB. Estos compuestos se diferencian entre sí en su peso molecular, tiempo de retención y fórmula molecular, sin embargo comparten parte de su estructura química. El patrón de fragmentación del ion 377,088 mostró la pérdida de 2 moléculas de agua ($[M-H-36]^- \rightarrow 341,07$ m/z), también común en AHB (Abad-García *et al.*, 2009), y de un grupo glucosil ($[M-H-162]^- \rightarrow 215,04$ m/z). Lo mismo ocurrió con el ion 539,143, que además de la pérdida de 2 moléculas de agua ($[M-H-36]^- \rightarrow 503,12$ m/z), presentó la pérdida de 1 grupo glucosil ($[M-H-162]^-$) dando como resultado el ion de m/z 377,09. Esto demuestra que el compuesto **2** presentaría en su estructura un grupo glucosil extra con respecto al compuesto **3**. La **Figura 2.8** muestra los espectros de UV, MS y MS/MS obtenidos para este último compuesto.

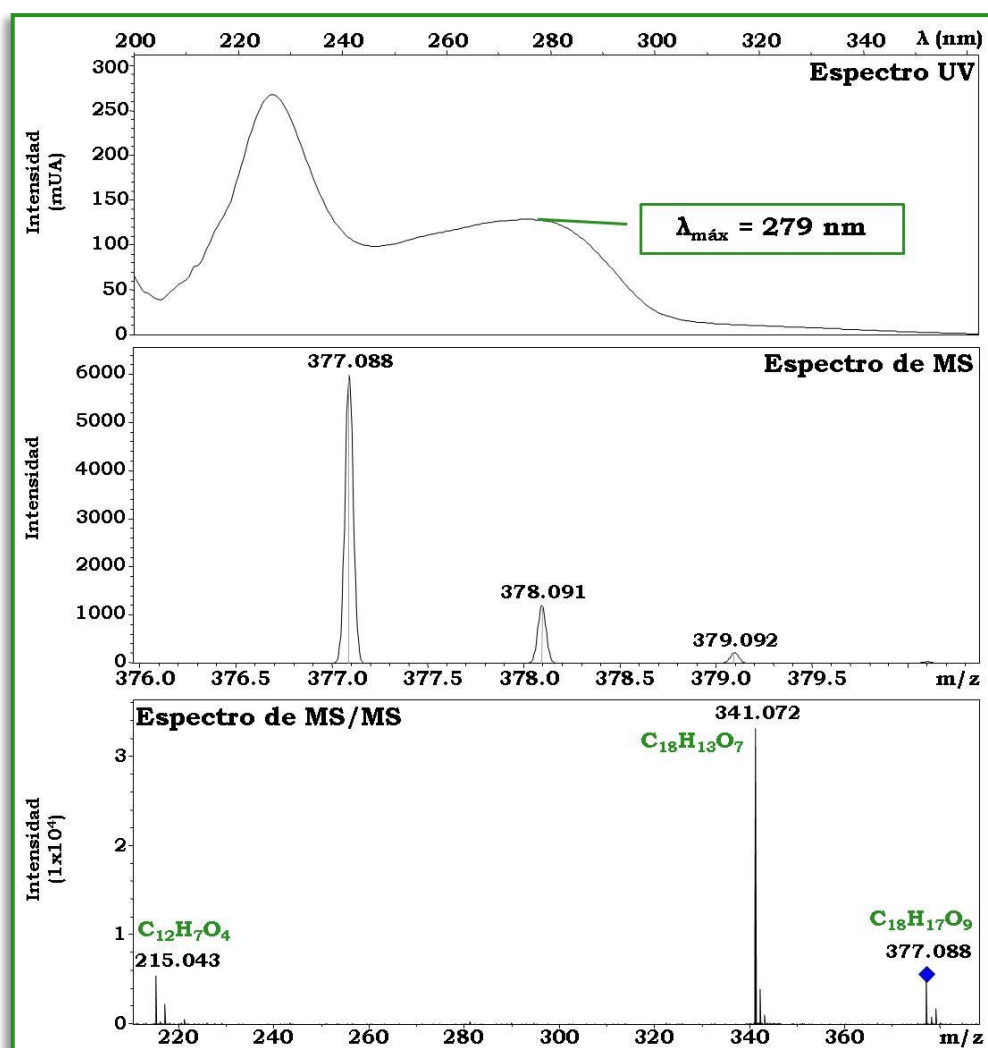


Figura 2.8. Espectros de UV, MS y MS/MS obtenidos para el compuesto 3.

No se han encontrado trabajos que reporten la presencia del compuesto 2, sin embargo Bauer *et al.* (2012), identificaron el compuesto 3 como un derivado de AHB en salvado de trigo después de aplicar una extracción con metanol e isopropanol (corresponde a la FL). Verardo *et al.* (2010), también encontraron un compuesto con el mismo ion precursor ($[M-H]^- = 377,087$) y fórmula molecular, en harina de trigo integral cuando se les realizó una extracción con etanol/agua (4:1), pero ellos no lograron identificarlo.

2.3.2.2. Ácidos hidroxicinámicos y sus derivados.

De los 25 compuestos identificados, 18 fueron derivados de AHC. Los compuestos **15** y **17** fueron confirmados a través de la comparación de sus TR y espectros de UV y MS con estándares comerciales. Ambos estuvieron presentes en la FU de los extractos de trigo, y el compuesto **17** también fue identificado en la FL de estos. El ácido *p*-cumárico (pico **15**) de m/z 163,041 (fórmula molecular $C_9H_7O_3$) fue detectado a un TR de 17,1 min, mientras que el ácido *trans*-ferúlico (pico **17**) de m/z 193,051 fue detectado a 17,3 min.

Otro AHC identificado en la FU fue el ácido *cis*-ferúlico (**18**), el cual aparece 0,9 min después que el ácido *trans*-ferúlico. Este compuesto de fórmula molecular $C_{10}H_9O_4$, mostró un espectro UV característico de los AHC con un máximo de absorción a 320 nm y un hombro a 295 nm, correspondientes al grupo cinamoil (Abad-García *et al.*, 2009). Adicionalmente el espectro de MS/MS de este compuesto mostró un ion característico de m/z 178,03, correspondiente a la pérdida de un CH_4 ($[M-H-16]^-$), al igual que el ácido *trans*-ferúlico.

La presencia de estos ácidos fenólicos en trigo ha sido reportada también por otros autores (Hernández *et al.*, 2011; Moore *et al.*, 2005; Verardo *et al.*, 2011; Verma *et al.*, 2009).

El compuesto **16**, de m/z 409,091, mostró un espectro UV característico de AHC, con un máximo de absorción UV a 322 nm y un hombro a 298 nm. La fórmula molecular determinada por el software provisto con el equipo de medición, fue $C_{22}H_{17}O_8$ y el patrón de fragmentación mostró dos picos de m/z 193,05 y 178,02 (**Figura 2.9**). Este compuesto fue identificado como un derivado del ácido ferúlico, pero no hemos encontrado antecedentes en la bibliografía.

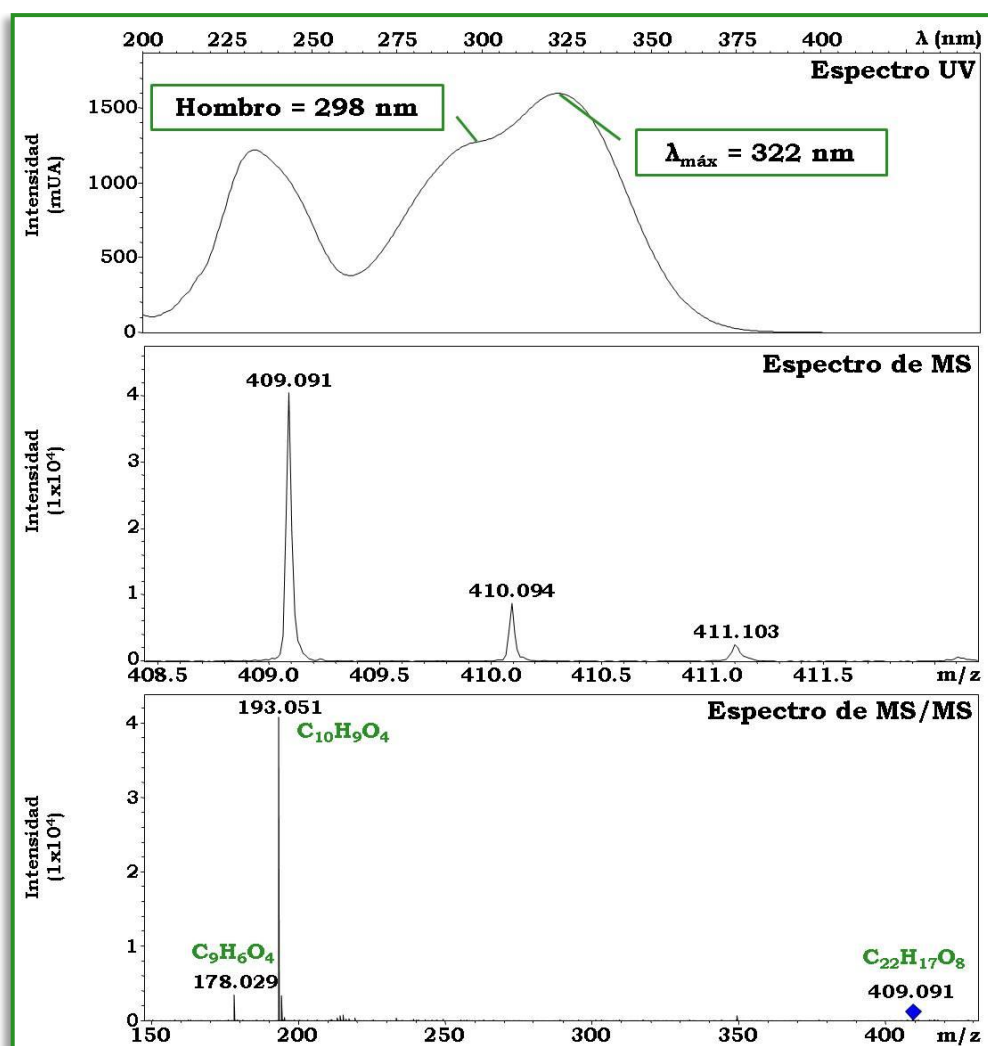


Figura 2.9. Espectros de UV, MS y MS/MS obtenidos para el compuesto 16.

El compuesto de m/z 409,176 (**21**) se encontró en la FL de los extractos de trigo. Este compuesto, de fórmula molecular $C_{25}H_{25}N_2O_5$, presentó un espectro UV característico de AHC con un máximo de absorción UV a 321 nm y un hombro a 285 nm. Por otro lado el patrón de fragmentación mostró dos picos de m/z 289,12 y 259,11. Este mismo compuesto fue encontrado por Bauer *et al.* (2012) en extractos alcohólicos de fibras de maíz (correspondiente a la FL) y ellos lo identificaron como *p*-coumaroil-feruloilputrescina. El fragmento de m/z 289,12 corresponde a la pérdida de un ácido cumárico descarboxilado ($[M-H-120]^-$), mientras que el fragmento de m/z 259,11 corresponde a la pérdida de un ácido ferúlico descarboxilado ($[M-H-150]^-$) (Bauer *et al.*, 2012).

↳ Dímeros y trímeros de ácido ferúlico.

Los dímeros y trímeros de ácido ferúlico se forman a través de reacciones de oxidación, catalizadas por peroxidasas, dentro de las plantas. Estos se encargan de entrecruzar los polímeros de la pared celular confiriéndole rigidez a la misma (Bunzel *et al.*, 2006). En general, estos compuestos sólo pueden ser extraídos del tejido vegetal a través de hidrólisis básicas, ácidas o enzimáticas, por eso se encuentran principalmente en la FU de los extractos polifenólicos (Pérez-Jiménez & Torres, 2011).

En la FU de los extractos de trigo analizados en esta tesis, se identificaron ocho dímeros y un trímero de ácido ferúlico. Adicionalmente, también se encontraron tres posibles dímeros de ácido ferúlico en la FL de los extractos de trigo, sin embargo los errores en la determinación de la masa exacta de estos últimos fueron altos, probablemente debido a que estuvieron presentes en menor proporción que los anteriores.

La identificación de los dímeros del ácido ferúlico se realizó por su masa exacta, espectros UV, y espectros de MS y MS/MS, como así también por comparación con la literatura. Los compuestos **7**, **9**, **10**, **11**, **12**, **13**, **14**, **19**, **20**, **22** y **24** (**Figura 2.7** y **Tabla 2.3**) presentaron el mismo ion precursor de m/z promedio 385,095 ($[M-H]^-$) y la misma fórmula molecular $C_{20}H_{17}O_8$, mientras que el compuesto **25**, también identificado como ácido diferúlico, exhibió un ion precursor de m/z 383,114 y fórmula molecular $C_{21}H_{19}O_7$.

Los espectros UV de estos compuestos fueron característicos de AHC con un máximo de absorción a 308-325 nm (Abad-García *et al.*, 2009). Por otro lado, los espectros de MS/MS obtenidos mostraron iones en común de m/z 341,10; 193,05; 282,08; 326,07; 267,10 y 297,11 (**Tabla 2.3**), los cuales fueron también reportados por Callipo *et al.* (2010); Bauer *et al.* (2012) y Chiremba *et al.* (2012) para ácidos diferúlicos en muestras de trigo, salvado de maíz y trigo, y cultivos de sorgo y maíz, respectivamente. En forma de ilustración, en la **Figura 2.10** se muestran los espectros correspondientes al compuesto **24**, donde se puede observar su patrón de fragmentación (espectro de MS/MS).

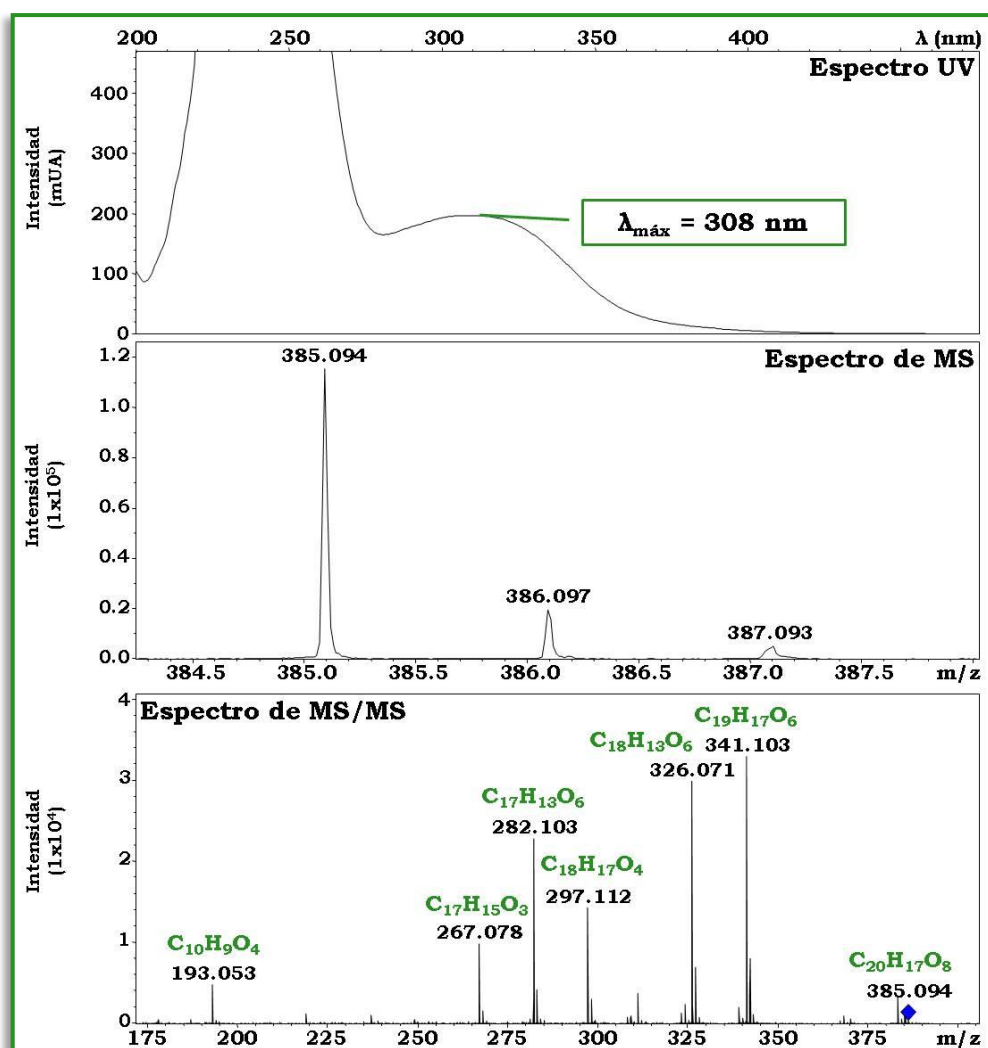


Figura 2.10. Espectro UV, espectro de MS y espectro de MS/MS del compuestos **24**.

Dentro de los fragmentos encontrados en estos compuestos, el ion 193,05 representa al ácido ferúlico, el cual fue identificado por su masa exacta experimental promedio de 193,051 m/z (error: -2,3 ppm), y su fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_4$. El ion de m/z 341,10 representa la pérdida de CO_2 ($[\text{M}-\text{H}-44]^-$), el ion de m/z 282,08 corresponde a la pérdida de 2 moléculas de CO_2 y una molécula de CH_4 ($[\text{M}-\text{H}-44-44-16]^-$), el ion 326,07 representa la pérdida del grupo $-\text{HCO}_2\text{CH}_3$ ($[\text{M}-\text{H}-60]^-$). La pérdida de 2 moléculas de CO_2 generó el ion de m/z 297,11 ($[\text{M}-\text{H}-44-44]^-$), y la pérdida de estas dos moléculas más una molécula de CH_2O generó el ion de m/z 267,10 ($[\text{M}-\text{H}-44-44-30]^-$). En la **Figura 2.11** se muestra un esquema de la posible fragmentación de un dímero del ácido ferúlico.

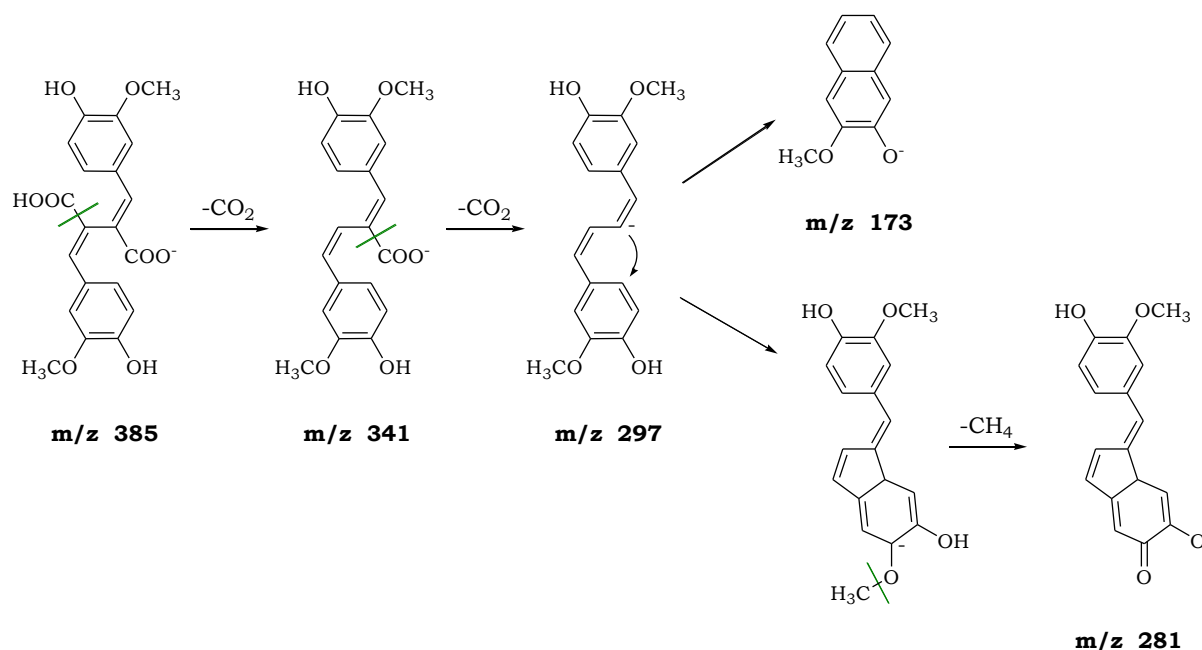


Figura 2.11. Esquema de la fragmentación del ácido 8,8'-diferúlico propuesta por Callipo *et al.* 2010.

La presencia de ADF en la FU de cereales ha sido ampliamente descrita en la literatura Hernández *et al.* (2011), reportaron 4 ADFs en 19 cultivos distintos de trigo. Bauer *et al.* (2012), encontraron 2 ADFs en la FU de extractos de salvado de trigo. Por otro lado Liu *et al.* (2010) identificaron 3 ADFs en la FU de extractos provenientes de 6 tipos de trigo pan. Sin embargo no hay antecedentes de estos compuestos en la FL de los mismos.

Los ADFs más comunes encontrados en tejidos vegetales, según la bibliografía consultada (Callipo *et al.*, 2010; Chiremba *et al.*, 2012; Holtejolen *et al.*, 2006; entre otros) son: ácido 8,8'-ariltetralin-diferúlico (8,8'-aril-ADF), ácido 8,8'-diferúlico (8,8'-ADF), ácido 8,5'-diferúlico (8,5'-ADF), ácido 5,5'-diferúlico (5,5'-ADF), ácido 8-O-4'-diferúlico (8-O-4'-ADF) y ácido 8,5'-benzofuran-diferúlico (8,5'-benzo-ADF) (**Figura 2.12**). Sin embargo hay discrepancias en la identificación de cada compuesto, entre distintos autores. Así por ejemplo, Chiremba *et al.* (2012), presentaron distintos patrones de fragmentación en 4 ADFs, con respecto a los que habían presentado Qiu *et al.* (2010), mientras que Guo & Beta (2013) mostraron patrones diferentes a los dos anteriores. Por lo que la elucidación de la estructura exacta de cada uno de estos compuestos, a través de espectrometría de masas, es realmente dificultosa. En este trabajo, los ADF se nombraron con el número de isómeros, para facilitar la interpretación de los resultados.

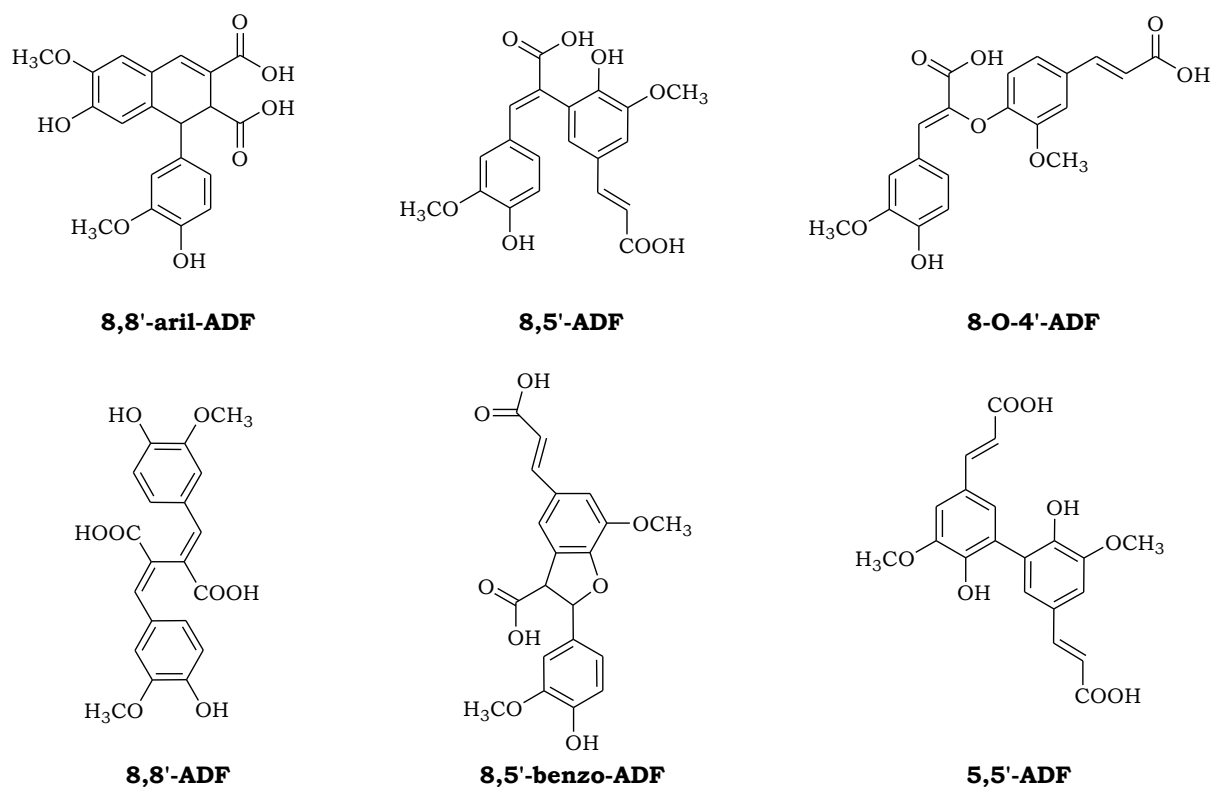


Figura 2.12. Estructura química de los 6 ADFs más comunes. Adaptado de Callipo *et al.* (2010).

Adicionalmente, otros autores lograron identificar al menos 12 dímeros de ADF, lo que está de acuerdo con los resultados encontrados en este estudio. Así por ejemplo Dobberstein & Bunzel (2010) lograron identificar 12 dímeros del ácido ferúlico a través de HPLC-PDA-¹H-NMR en distintos cereales, mientras que Callipo *et al.* (2010), identificaron 19 ADFs en extractos de plantas de trigo. La gran variedad de estos compuestos podría ser explicada por la presencia de dos isómeros del ácido ferúlico (*trans* y *cis*) en el trigo, ya que la dimerización de ácidos ferúlicos dentro de las plantas puede ocurrir de la forma *trans-trans*, *trans-cis* o *cis-cis* (Callipo *et al.*, 2010).

Finalmente, HPLC-DAD-MS en modo negativo de la FU de los extractos de trigo, mostró un pico de m/z 577,136 (pico base $[M-H]^-$) y fórmula molecular $C_{30}H_{25}O_{12}$ (compuesto **23**), sugiriendo un peso molecular de 578,144 correspondiente a un ácido triferúlico (ATF) (Chandrasekara & Shahidi, 2011). El patrón de fragmentación de este compuesto mostró tres picos característicos: el pico de m/z 385,09 generado por la pérdida de un ácido ferúlico desprotonado ($[M-H-192]^-$) que corresponde a un ADF; el pico de m/z 341,10 correspondiente a la pérdida de un ácido ferúlico desprotonado más una molécula de CO_2 ($[M-H-192-44]^-$); y por último el pico de m/z 193,05 que denota la presencia del ácido ferúlico (**Figura 2.13**).

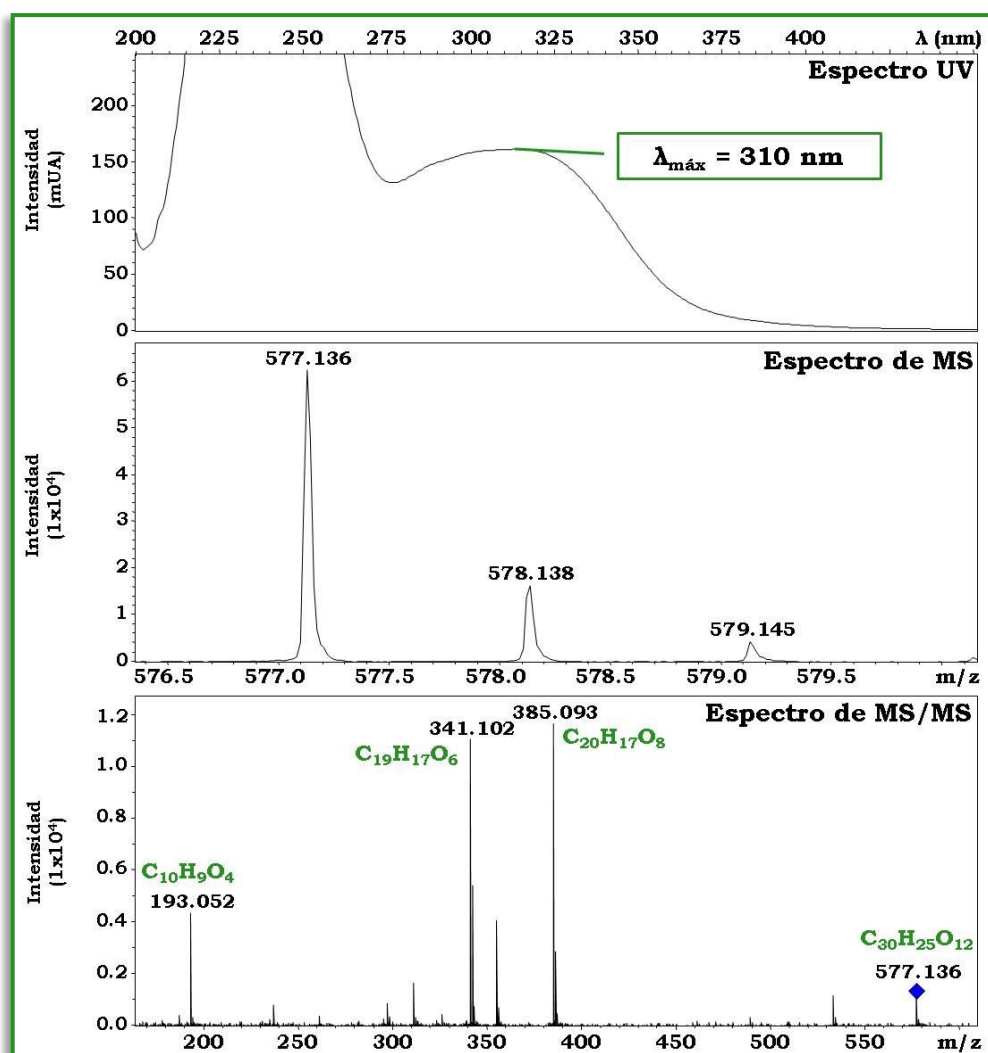


Figura 2.13. Espectro UV, espectro de MS y espectro de MS/MS del compuesto **23**.

2.3.2.3. Flavonas.

De los 25 compuestos identificados en los extractos de trigo, 3 pertenecieron a la subclase flavonas, de la familia de los flavonoides. Estos compuestos fueron encontrados en la FL de los extractos de trigo, y mostraron espectros UV característicos de las flavonas (Abad-García *et al.*, 2009).

El compuesto **5** presentó un ion precursor de m/z 579,135 y una fórmula molecular $C_{26}H_{27}O_{15}$. El espectro MS/MS de este compuesto mostró 3 fragmentos de m/z 489,09; 459,09 y 399,06 correspondientes a la pérdida de masa de 90, 120 y 180, respectivamente. Liu *et al.* (2010) identificaron este ion precursor como chrisoeriol-6,8-di-C-pentósido en extractos metanólicos acidificados de trigo pan.

Los picos **6** y **8** mostraron el mismo ion molecular desprotonado con m/z 563,142 y los espectros de MS/MS obtenido de cada uno de ellos presentaron dos iones comunes de m/z 443,10 y 353,07, lo que indicaría que estos compuestos son isómeros. El ion de m/z

443,10 representa la pérdida de masa 120, la cual corresponde a la fragmentación de un C-glucósido (Brazier-Hicks *et al.*, 2009). Cuando un flavonoide está sustituido con un C-glucósido, la fragmentación muestra que el aglicón apenas se separa del ion parental. Liu *et al.* (2010) sugiere que el ion del aglicón más una masa de 83 se utiliza para ilustrar el aglicón presente en los flavonoides C-glucósidos. En estos picos, el fragmento de m/z 353,07 corresponde al aglicón + 83 ($[M-H+83]^-$) indicando que la masa exacta del aglicón es 270,08 g/mol, correspondiente a apigenina. Hasta el momento, sólo se ha observado uniones C-glucósido en la posición 6 y 8 de los flavonoides (Cuyckens & Claeys, 2004). Entonces se puede suponer que estos compuestos corresponden a isómeros de apigenina 6/8-C-pentósido-8/6-C-hexósido (270,053 + 162,053 + 132,042 = 564,148). En la **Figura 2.14** se muestran los espectros UV, MS y MS/MS del compuesto **6**, y su esquema de fragmentación.

2.3.3. Cuantificación de compuestos polifenólicos.

La **Tabla 2.4** muestra los resultados obtenidos de la cuantificación de compuestos polifenólicos individuales en la FL de los extractos de distintas variedades de trigo. El compuesto mayoritario en esta fracción, en todas las variedades estudiadas fue el glucósido de ácido hidroxibenzoico (**3**) (**Tabla 2.3**), el cual presentó valores en un intervalo entre 20 y 32 mg/100 g de peso seco de muestra. La variedad Buck 75 Aniversario mostró los valores estadísticamente más altos ($p < 0,05$) de este compuesto, mientras que el resto de las variedades no mostraron valores significativamente diferentes entre sí. Hasta el momento, sólo dos trabajos informan la presencia de este compuesto en la FL de extractos de trigo integral (Verardo *et al.*, 2010 y Bauer *et al.*, 2012), sin embargo en ninguno de los dos ha sido cuantificado.

Por otro lado, en la **Tabla 2.5** se muestran los resultados obtenidos para la FU de los extractos de trigo. El compuesto mayoritario encontrado en esta fracción fue el n° **17** (ác. *trans*-ferúlico), seguido del n° **20** (isómero 9 de ADF). Ambos compuestos mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las distintas variedades de trigo estudiadas. La variedad ACA 903 B presentó los valores más altos de ác. *trans*-ferúlico (**17**) y, junto con ACA 315, BAGUETTE PREMIUM 11, cronox, KLEIN GUERRERO y KLEIN YARARÁ mostraron los valores significativamente más altos del isómero 9 de ADF (**20**).

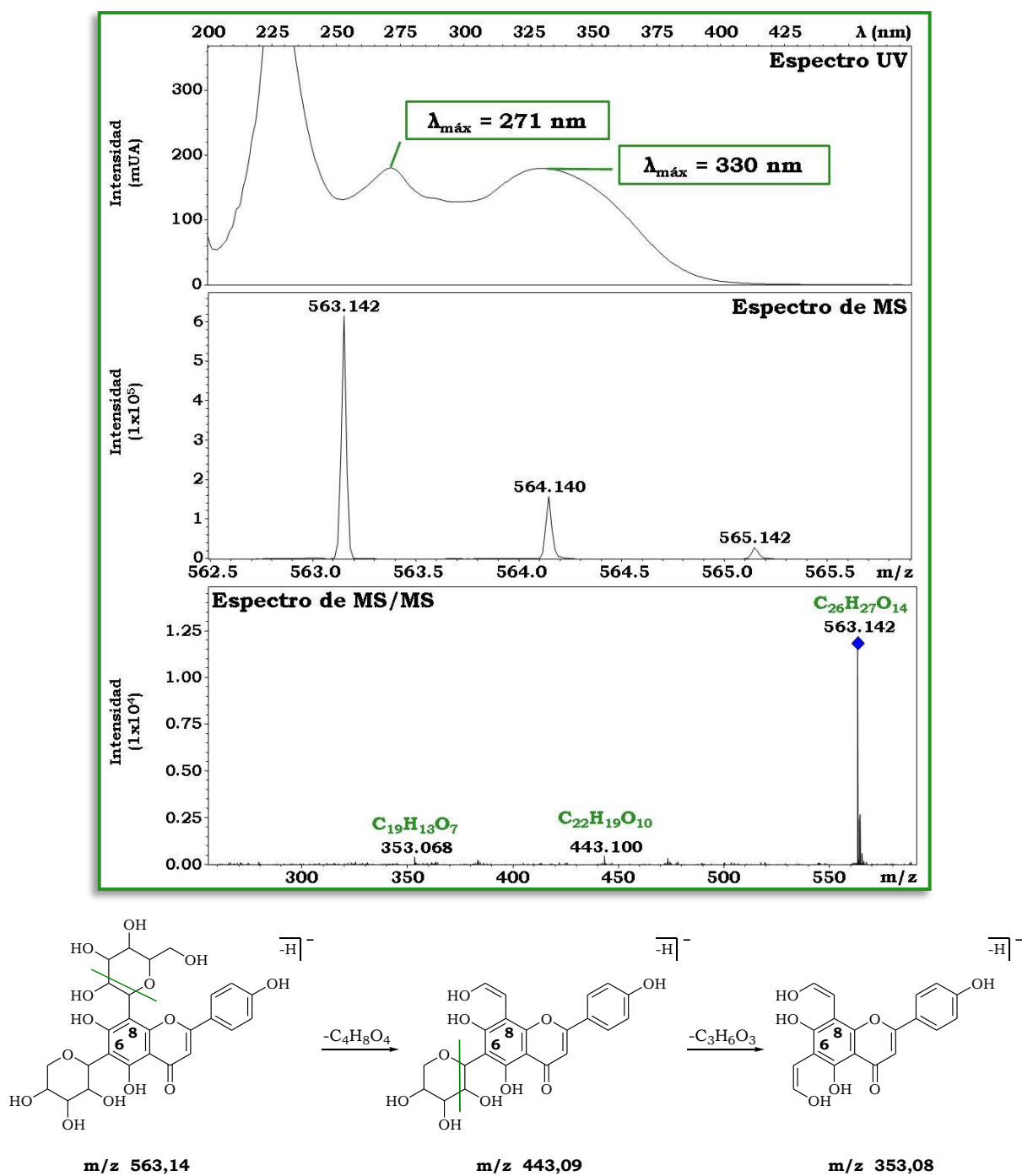


Figura 2.14. Espectro UV, espectro de MS, espectro de MS/MS y esquema de fragmentaci3n del compuesto 6.

Tabla 2.4. Cuantificación de los compuestos polifenólicos identificados en la FL de extractos de distintas variedades de trigo. Los resultados se expresan en mg/100 g de muestra seca.

Variedad	1	2	3	4	5	6	8	10	11	13	17	21
ACA 303	< LC	12 ± 4 b	24 ± 7 b	4 ± 3 b	0,0077 ± 0,0018 c	0,45 ± 0,20 b	0,24 ± 0,10 b	0,31 ± 0,17 b	1,1 ± 0,3 b	2,2 ± 0,5 b	0,26 ± 0,05 a	< LC
ACA 315	<LC	16 ± 3 a	27 ± 5 b	6 ± 4 a	0,009 ± 0,004 c	0,25 ± 0,06 c	0,17 ± 0,04 c	0,52 ± 0,20 a	1,4 ± 0,4 a	3,2 ± 1,0 a	0,4 ± 0,7 a	< LD
ACA 320	<LC	13 ± 6 b	22 ± 8 b	4 ± 3 b	0,0113 ± 0,0021 b	0,61 ± 0,26 a	0,33 ± 0,05 a	0,58 ± 0,23 a	1,4 ± 0,6 a	2,5 ± 0,8 b	0,26 ± 0,06 a	< LC
ACA 903 B	0,10 ± 0,06	12 ± 6 b	27 ± 10 b	2,9 ± 2,0 b	0,0061 ± 0,0016 d	0,40 ± 0,14 b	0,27 ± 0,08 b	< LC	0,8 ± 0,4 b	1,7 ± 0,7 b	0,20 ± 0,04 b	0,22 ± 0,17
B. PREMIUM 11	0,12 ± 0,04	13,5 ± 2,5 b	27 ± 3 b	3 ± 3 b	0,0056 ± 0,0025 d	0,27 ± 0,13 c	0,19 ± 0,07 c	0,33 ± 0,18 b	0,9 ± 0,4 b	2,5 ± 1,3 b	0,30 ± 0,07 a	0,4 ± 0,6
BIOINTA 3004	0,14 ± 0,15	11 ± 4 b	27 ± 9 b	8 ± 4 a	0,032 ± 0,011 a	0,7 ± 0,6 a	0,4 ± 0,3 a	0,23 ± 0,17 c	0,6 ± 0,3 b	1,8 ± 0,6 b	0,28 ± 0,12 a	0,17 ± 0,26
BUCK 75 ANIVER.	< LC	15,3 ± 2,6 a	32,0 ± 2,4 a	3 ± 3 b	0,015 ± 0,004 b	0,93 ± 0,15 a	0,41 ± 0,08 a	0,20 ± 0,13 c	0,98 ± 0,15 b	1,93 ± 0,24 b	0,30 ± 0,03 a	0,3 ± 0,3
cronox	< LC	10 ± 7 b	20 ± 15 b	6 ± 4 a	0,026 ± 0,016 a	0,8 ± 0,8 a	0,5 ± 0,4 a	0,20 ± 0,22 c	0,9 ± 0,6 b	2,0 ± 1,5 b	0,23 ± 0,15 a	< LD
K. CAPRICORNIO	< LC	10,0 ± 2,4 b	27 ± 5 b	1,5 ± 1,4 b	0,0115 ± 0,0021 b	0,82 ± 0,12 a	0,38 ± 0,08 a	0,32 ± 0,05 b	0,7 ± 0,4 b	1,4 ± 0,6 b	0,229 ± 0,025 a	0,32 ± 0,19
K. GUERRERO	< LC	14,7 ± 1,7 a	28 ± 7 b	4,9 ± 1,7 b	0,022 ± 0,003 a	0,58 ± 0,23 a	0,38 ± 0,12 a	0,40 ± 0,14 b	0,9 ± 0,3 b	2,3 ± 1,4 b	0,24 ± 0,03 a	0,32 ± 0,14
K. YARARA	< LC	9 ± 5 b	23 ± 11 b	3 ± 3 b	0,024 ± 0,006 a	0,7 ± 0,5 a	0,48 ± 0,20 a	< LC	0,5 ± 0,4 b	1,4 ± 0,5 b	0,23 ± 0,06 a	< LC
LE 2330	0,10 ± 0,05	10,9 ± 1,7 b	28 ± 8 b	3,7 ± 2,0 b	0,0130 ± 0,0022 b	0,66 ± 0,20 a	0,37 ± 0,08 a	0,20 ± 0,05 c	0,83 ± 0,24 b	1,4 ± 0,3 b	0,24 ± 0,03 a	0,16 ± 0,17

<LD significa menor al límite de detección y <LC menor al límite de cuantificación. LD metodológico (mg/100g): **21** (0,05). LC metodológico (mg/100g): **1** (0,08), **10** (0,2) y **21** (0,14). Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre variedades ($p < 0,05$).

Tabla 2.5. Cuantificación de los compuestos polifenólicos identificados en la FU de extractos de distintas variedades de trigo. Los resultados se expresan en mg/100 g de muestra seca.

Variedad	7	9	12	14	15	16	17	18	19	20	22	23	24	25
ACA 303	1,4 ± 0,6	2,8 ± 0,9 b	3,6 ± 1,8 b	4,5 ± 1,3 b	0,47 ± 0,17 b	2,2 ± 1,0 a	19 ± 5 b	3,8 ± 1,6 b	5 ± 3 b	10 ± 5 b	4,6 ± 2,1 b	< LC	5,3 ± 2,2 b	2,2 ± 0,9 b
ACA 315	2,0 ± 0,7	5,2 ± 2,5 a	5,3 ± 2,0 a	8 ± 4 a	0,71 ± 0,23 a	2,0 ± 0,6 a	21,5 ± 2,5 b	5,1 ± 1,7 a	8 ± 4 a	18 ± 8 a	9 ± 4 a	3,1 ± 1,7 a	10 ± 5 a	4,2 ± 1,7 a
ACA 320	1,3 ± 0,7	2,7 ± 1,5 b	3,6 ± 1,6 b	4,7 ± 1,8 b	0,38 ± 0,07 b	2,5 ± 0,9 a	21 ± 4 b	3,8 ± 1,6 b	5 ± 3 b	12 ± 4 b	4 ± 3 b	2,0 ± 1,2 b	5 ± 3 b	2,3 ± 0,7 b
ACA 903 B	1,6 ± 0,6	2,9 ± 0,6 b	4,4 ± 1,1 a	6,1 ± 1,3 a	0,44 ± 0,13 b	2,2 ± 0,9 a	24,6 ± 1,9 a	5,6 ± 1,9 a	6,1 ± 2,0 b	12,8 ± 1,5 a	5,8 ± 1,5 a	2,5 ± 0,7 b	7,2 ± 2,4 a	3,2 ± 0,9 b
B. PREMIUM 11	1,6 ± 0,8	3 ± 3 b	4 ± 3 a	6 ± 5 a	0,9 ± 0,6 a	1,4 ± 0,4 b	16,6 ± 2,2 c	4,8 ± 1,8 a	6 ± 5 b	13 ± 9 a	6 ± 6 a	2,1 ± 1,9 b	8 ± 6 a	2,8 ± 1,4 b
BIOINTA 3004	< LC	2,6 ± 1,6 b	< LC	3,9 ± 2,4 b	0,6 ± 0,3 b	1,7 ± 0,9 a	14 ± 6 c	3,1 ± 1,6 b	4,0 ± 2,0 b	9 ± 5 b	3,8 ± 2,1 b	< LC	5 ± 3 b	2,2 ± 1,2 b
BUCK 75 ANIVER.	1,6 ± 0,8	2,8 ± 1,3 b	3,6 ± 1,5 b	4,4 ± 1,2 b	0,55 ± 0,20 b	2,3 ± 0,9 a	21 ± 3 b	5,1 ± 1,4 a	6 ± 3 b	11 ± 2 b	4,6 ± 2,0 b	< LC	5,5 ± 1,8 b	2,1 ± 0,8 b
cronox	< LC	2,6 ± 1,0 b	< LC	4,1 ± 1,2 b	0,64 ± 0,24 a	2,9 ± 0,8 a	21,2 ± 2,2 b	6,2 ± 0,8 a	5,0 ± 1,4 b	12,8 ± 1,1 a	3,8 ± 0,7 b	< LC	5,7 ± 2,0 b	2,2 ± 0,9 b
K. CAPRICORNIO	< LC	< LC	< LC	< LC	0,41 ± 0,13 b	2,7 ± 0,9 a	14 ± 6 c	2,7 ± 1,1 b	4 ± 5 b	8 ± 4 b	< LC	< LC	4,3 ± 2,6 b	1,6 ± 0,9 c
K. GUERRERO	1,7 ± 1,1	5 ± 5 a	6 ± 5 a	8 ± 8 a	0,7 ± 0,4 a	2,2 ± 1,0 a	19 ± 4 b	4,5 ± 2,5 a	10 ± 9 a	18 ± 13 a	10 ± 10 a	4 ± 3 a	11 ± 10 a	4 ± 3 a
K. YARARA	1,6 ± 1,0	3,2 ± 2,0 b	< LC	5 ± 3 b	0,54 ± 0,19 b	2,7 ± 1,1 a	22 ± 3 b	5,6 ± 1,6 a	6 ± 4 b	14 ± 5 a	5 ± 4 b	2,3 ± 1,9 b	8 ± 4 a	2,6 ± 1,0 b
LE 2330	< LC	< LC	< LC	< LC	0,50 ± 0,11 b	2,6 ± 1,1 a	16 ± 6 c	4,1 ± 1,1 b	3,9 ± 2,1 b	9 ± 3 b	< LC	< LC	4,2 ± 1,4 b	1,3 ± 0,6 c

<LC menor al límite de cuantificación. LC metodológico (mg/100g): **7** (1,2), **9** (2,6), **12** (3,4), **14** (3,4), **22** (3,5) y **23** (2,0). Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre variedades ($p < 0,05$).

Numerosos trabajos científicos han reportado que el ác. ferúlico es el ácido hidroxicinámico predominante cuando se evalúan extractos hidrolizados de muestras de trigo entero, o de extractos de salvado de trigo (Bauer *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2004; entre otros), lo que está de acuerdo con los resultados encontrados en esta tesis.

El contenido de ác. *trans*-ferúlico (de 14 a 25 mg/100 g de peso seco de muestra) entre las distintas variedades de trigo analizadas en este estudio mostró valores similares a los encontrados por Zhou *et al.* (2004) (9-11 mg/100g) en extractos hidrolizados de salvado de 7 variedades de trigo procedentes de 4 países diferentes (Suiza, Canadá, Australia y Estados Unidos), y estuvo en el mismo rango (23,2-75,2 mg/100g) que los encontrados por Serpen *et al.* (2008), en extractos de trigo entero de 18 variedades distintas. Sin embargo estos resultados estuvieron por debajo de los encontrados por Verma *et al.* (2009) (84-166 mg/100g), y fueron 10 veces menores a los reportados por Bauer *et al.* (2012) (270-380 mg/100g).

El resto de los polifenoles identificados (excepto los compuestos **1**, **7** y **21**), en las dos fracciones (FL y FU) de los extractos de trigo, presentaron valores significativamente diferentes entre variedades. En la **Figura 2.15** y en la **Figura 2.16** se ilustra el perfil de compuestos polifenólicos de cada una de las variedades estudiadas. La **Figura 2.15** muestra el perfil en la FL de los extractos de trigo, mientras que la **Figura 2.16** presenta el perfil en la FU de estos.

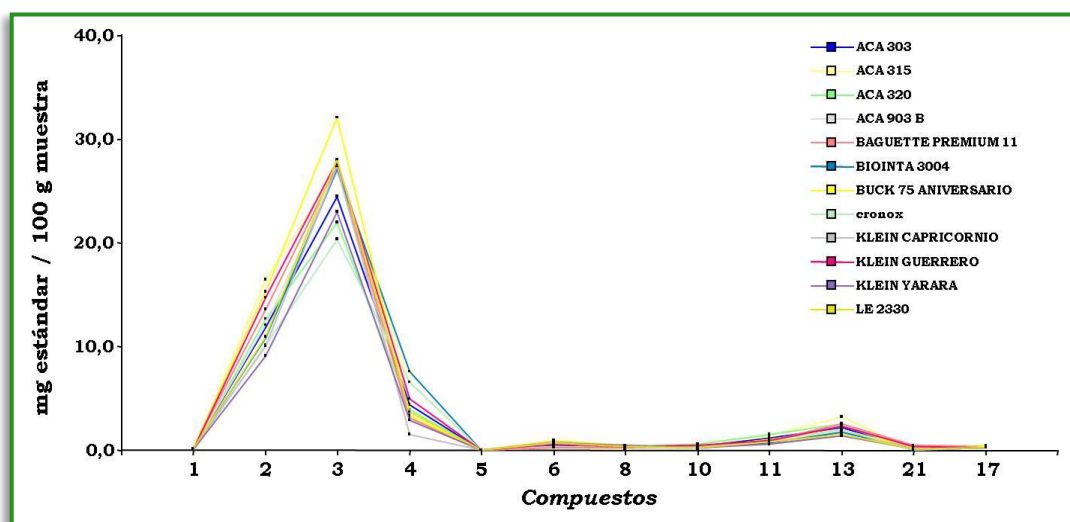


Figura 2.15. Perfiles de polifenoles en la FL de extractos de distintas variedades de trigo.

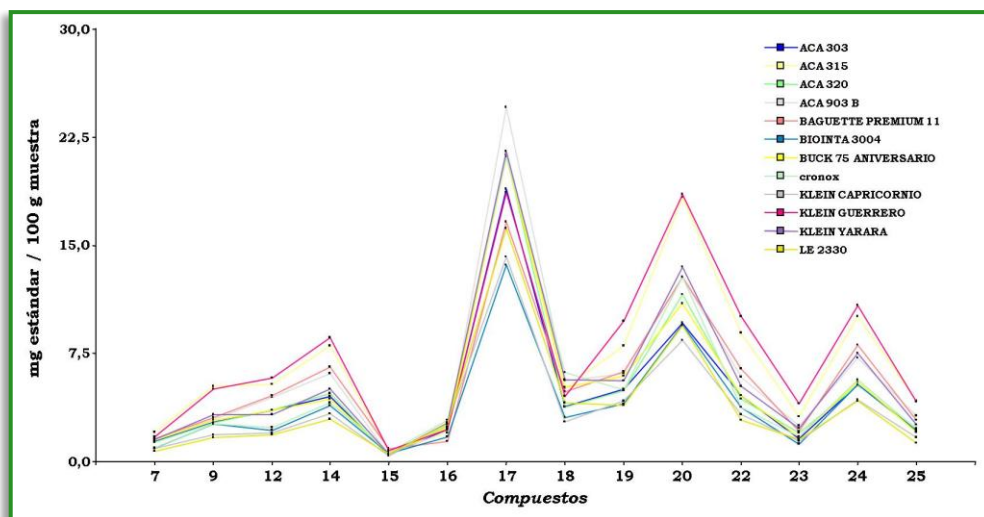


Figura 2.16. Perfiles de polifenoles en la FU de extractos de distintas variedades de trigo.

2.3.4. Discriminación entre distintas variedades de trigo. Influencia de la zona y el año de producción.

En la sección anterior, se encontró que, en general, el contenido y tipo de compuesto polifenólico en cada una de las fracciones de polifenoles estudiadas varía con la variedad. Entonces, para evaluar si el perfil de polifenoles es capaz de discriminar entre distintas variedades de trigo, se aplicó un análisis de componentes principales (ACP) teniendo en cuenta los 25 compuestos identificados. La **Figura 2.17** muestra el gráfico biplot obtenido para este análisis.

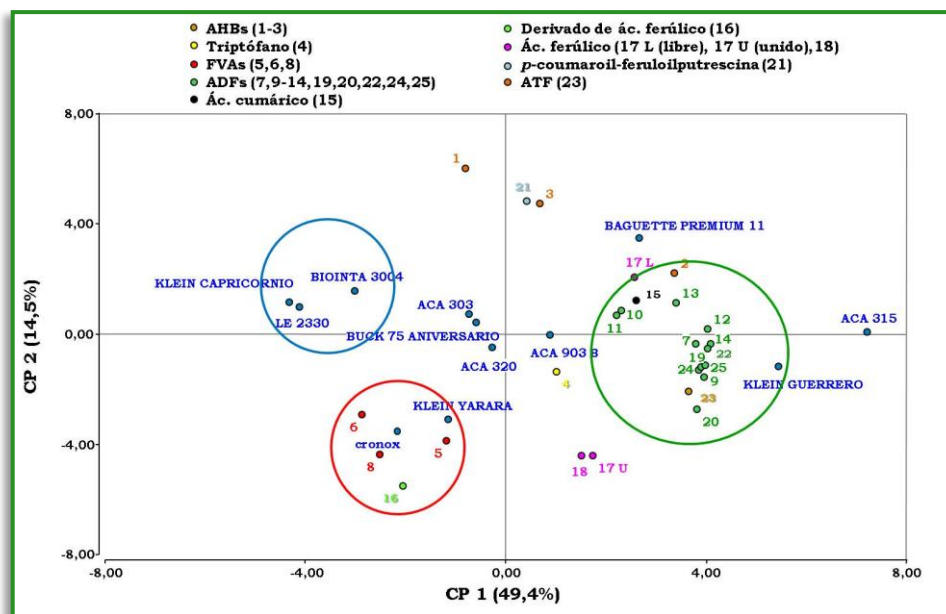


Figura 2.17. Biplot de extractos de distintas variedades de trigo.

El modelo generado a partir del ACP utilizó cuatro nuevas variables (componentes principales, CP), para explicar el 84 % de la variabilidad encontrada en los datos analizados. La primer componente principal (CP 1) explicó el 49,4 % de la variabilidad encontrada entre las distintas variedades de trigo estudiadas, mientras que la segunda componente principal (CP 2) explicó el 14,5 % de esta.

En la **Tabla 2.6** se muestran los autovectores (e1 y e2) arrojados por el ACP de los extractos de trigo. Se puede observar que todos los ADF provenientes de la FU de los extractos de trigo analizados son los que más aportan a la CP 1. Analizando la **Figura 2.17**, estos compuestos permiten diferenciar las variedades ACA 315 y KLEIN GUERRERO de las variedades KLEIN CAPRICORNIO, LE 2330 y BIOINTA 3004. Por otro lado, el compuesto **1** posee un valor absoluto elevado del coeficiente e2, seguido por los compuestos **21**, **3**, **8**, **17 U** y **18**, lo que indica que estos compuestos explican la variabilidad de las muestras en la CP 2, la cual permite separar la variedad BAGOETTE PREMIUM 11 de la variedad Cronox.

Tabla 2.6. Autovectores e1 y e2 obtenidos para el ACP de extractos de diferentes variedades de trigo.

	Variables	e1	e2
1	ác. 2-hidroxi-3-O-β-D-glucopiranosilbenzoico	-0,05	0,40
2	diglucósido de ácido hidroxibenzoico	0,22	0,14
3	glucósido de ácido hidroxibenzoico	0,05	0,31
4	triptófano	0,07	-0,09
5	crisoeriol-6,8-di-C-pentósido	-0,08	-0,26
6	8-C-glucosil-6-C-arabinosil-apigenina	-0,19	-0,19
8	6-C-glucosil-8-C-arabinosil-apigenina	-0,17	-0,29
10	ác. diferúlico (isómero 3)	0,15	0,06
11	ác. diferúlico (isómero 4)	0,15	0,04
13	ác. diferúlico (isómero 6)	0,23	0,07
17 FL	ác. <i>trans</i> -ferúlico	0,17	0,14
21	<i>p</i> -coumaroil-feruloilputrescina	0,03	0,32
7	ác. diferúlico (isómero 1)	0,25	-0,03
9	ác. diferúlico (isómero 2)	0,26	-0,10
12	ác. diferúlico (isómero 5)	0,27	0,01
14	ác. diferúlico (isómero 7)	0,27	-0,03
15	ác. cumárico	0,17	0,08
16	derivado de ác. ferúlico	-0,13	-0,37
17 FU	ác. <i>trans</i> -ferúlico	0,11	-0,29
18	ác. <i>cis</i> -ferúlico	0,10	-0,29
19	ác. diferúlico (isómero 8)	0,26	-0,09
20	ác. diferúlico (isómero 9)	0,25	-0,18
22	ác. diferúlico (isómero 10)	0,27	-0,04
23	ác. triferúlico	0,24	-0,14
24	ác. diferúlico (isómero 11)	0,26	-0,08
25	ác. diferúlico (isómero 12)	0,26	-0,08

El ACP demuestra que el perfil de compuestos polifenólicos depende de la variedad de trigo estudiada, siendo los ADF los compuestos más importantes para la discriminación entre variedades.

Todos los ácidos diferúlicos presentes en la FU de los extractos de trigo evaluados, mostraron mayores concentraciones en las variedades ACA 315 y KLEIN GUERRERO (**Tabla 2.5**). La suma individual de cada uno de estos compuestos, para obtener el contenido total de ADF en la FU de los extractos, arrojó valores de 74,4 mg/100 g de muestra en la variedad KLEIN GUERRERO y 70,2 mg/100 g de muestra para la variedad ACA 315. Por otro lado el contenido total de ADF en la FU de las variedades LE 2330, KLEIN CAPRICORNIO y BIOINTA 3004, presentó valores de 28,7, 29,8 y 34,4 mg/100 g de muestra, respectivamente. Estos resultados coinciden con los reportados en la literatura. Lempereur *et al.* (1998) encontraron diferencias significativas en ADFs entre distintas variedades de

trigo provenientes del sur de Francia, con valores entre 48,7 mg/100 g para la variedad Ardenete y 87,4 mg/100 g para la variedad Capdur. Adicionalmente, estudios más recientes, mostraron diferencias significativas en ADF en 6 variedades diferentes de trigos provenientes de Dinamarca, con un rango de 13,9 mg/100 g en la variedad AC Vista a 19,9 mg/100 g en la variedad Konini (Liu *et al.*, 2010), y en 19 variedades de trigo provenientes de las Islas Canarias, con un contenido total de ADFs en un rango de 2,4 mg/100 g a 9,9 mg/100 g para las variedades Raposo y Raspinegro canario, respectivamente (Hernández *et al.*, 2011).

Otros trabajos reportaron diferencias significativas en otros compuestos polifenólicos, entre distintas variedades de trigo estadounidenses (Adom *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 2006), italianos (Heimler *et al.*, 2010) y chinos (Zhang *et al.*, 2012). Sin embargo, no hemos encontrado trabajos que diferencien variedades de trigo argentino a través del perfil de compuestos polifenoles.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que hay una fuerte influencia del genotipo (variedad) en el perfil de compuestos polifenólicos, sin embargo, algunos autores confirman que el medio ambiente y las condiciones de cultivo, también pueden afectar al contenido y la composición de compuestos polifenólicos en muestras de trigo (Heimler *et al.*, 2010; Stracke *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012).

Para estudiar si la zona de cultivo afectan el perfil de polifenoles en las variedades de trigo evaluadas en este estudio, se realizó un análisis de la varianza teniendo en cuenta la variedad (V), la zona de cultivo (Z) y la interacción entre estas dos (V x Z). En la **Tabla 2.7** se muestran los valores del estadístico F, junto con el grado de significancia, obtenido para cada uno de los 25 compuestos cuantificados.

La concentración de 9 (**2, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 13 y 21**) de los 12 compuestos polifenólicos encontrados en la FL de los extractos de trigo analizados, mostraron una fuerte influencia de la variedad, mientras que sólo los compuestos derivados de AHB (**1, 2 y 3**) y los derivados de ADF (**10, 11 y 13**), mostraron una influencia significativa de la zona (SUB I, SUB IIN, SUB IV y SUB VN) donde se desarrollaron las distintas variedades de trigo. Por otro lado sólo se observó una influencia de la interacción entre la variedad y la zona para el compuesto **13**, mientras que el resto de los compuestos no mostraron variaciones en su concentración debido a una interacción entre el genotipo (variedad) y el ambiente (zona).

Tabla 2.7. Estadístico F para un análisis combinado de la varianza para concentraciones de los distintos polifenoles cuantificados en la FL y en la FU de 12 variedades diferentes de trigo cultivadas en 4 zonas distintas, en dos años de producción.

Compuesto	Variedad y Zona			Variedad y Año		
	V	Z	V x Z	V	A	V x A
Fracción Libre						
1	1,86	3,87 *	0,29	1,77	1,18	0,24
2	4,91 ***	5,19 **	0,74	3,58 **	0,13	0,73
3	1,84	11,04 ***	1,13	1,01	2	0,53
4	2,3 *	2,13	0,33	3,88 **	66,55 ***	0,41
5	24,62 ***	1,06	0,63	25,54 ***	0,79	2,71 *
6	2,87 *	0,22	0,39	5,1 ***	8,37 **	2,71 *
8	4,2 ***	0,37	0,69	3,95 ***	3,83	2,78 **
10	6,94 ***	3,13 *	0,99	8,31 ***	5,45 *	1,88
11	12,7 ***	15,6 ***	1,69	6,49 ***	1,27	0,45
13	8,95 ***	11,54 ***	2,03 *	4,81 ***	1,35	0,29
17	0,51	0,22	0,42	0,7	0,2	0,79
21	3,46 **	0,29	1,58	1,38	16,78 ***	1,27
Fracción Unida						
7	5,48 ***	14,01 ***	1,85 *	3,03 **	1,13	2,28 *
9	3,62 **	9,95 ***	1,65	3,47 **	0,05	1,45
12	4,94 ***	12,2 ***	2,09	3,03 **	2,31	1,38
14	4,02 **	10,67 ***	2,18 *	2,88 **	0,01	1,05
15	3,05 **	4,23 **	2,40 **	2,8 **	0,31	1,6
16	3,33 **	28,56 ***	1,68	2,6 *	6,28 *	1,7
17	5,33 ***	1,22	1,74 *	5,03 ***	0,01	0,79
18	1,99	1,84	0,39	2,4 *	0,03	1,24
19	3,19 **	17,91 ***	2,74 **	1,82	0,88	0,59
20	4,13 ***	7,57 ***	1,77	2,95 **	0,87	0,62
22	4,54 ***	14,19 ***	2,39 **	3,16 **	0,07	1,09
23	4,24 ***	10,79 ***	2,05 **	2,42 *	0,02	0,75
24	3,90 **	12,1 ***	2,35 **	2,8 **	0,1	1,49
25	5,81 ***	6,62 ***	2,11 *	5,21 ***	0,31	1,72

Resultados con * fueron significativos a $p < 0,05$; ** significativos a $p < 0,01$; *** significativos a $p < 0,001$.

Resultados sin * no fueron significativos.

Por otro lado, los compuestos polifenólicos presentes en la FU de los extractos de trigo, mostraron una importante influencia del genotipo, pero también la zona de cultivo presentó una gran influencia sobre la mayoría de ellos, excepto para los dos ácidos ferúlicos identificados (compuestos **17** y **18**). La zona SUB IV fue la que presentó los valores más altos de casi todos estos compuestos, con la excepción de los compuestos **16** y **17** (**Anexo II, Tabla II.1**). Adicionalmente, se observó que la concentración de los compuestos **7**, **14**, **15**, **17**, **19**, **22**, **23**, **24** y **25** están influenciadas por una interacción entre la variedad y la zona de cultivo. La mayoría de estos compuestos, excepto, el **15** (ác cumárico) y el **22** (ATF)

también fueron importantes en la discriminación de muestras de trigo por variedad (**Tabla 2.6**), presentando mayores concentraciones en la variedad ACA 315 y en la variedad KLEIN GUERRERO (**Tabla 2.5**).

Los compuestos presentes en la FU de los extractos de trigo parecen ser los más afectados por la zona donde se cultivan las distintas variedades de trigo estudiadas, siendo la zona SUB IV la más favorable para desarrollar trigos con alto contenido en compuestos polifenólicos en esta fracción (**Anexo II, Tabla II.1**).

Si se analizan los distintos polifenoles presentes en la FU de los extractos de trigo (**Tabla 2.5**) por variedad y se estudia cómo estos compuestos varían entre las distintas zonas muestreadas (**Anexo II, Tabla II.1**), se puede concluir que las variedades con mejores propiedades antioxidantes potenciales son ACA 315 y KLEIN GUERRERO provenientes de la zona SUB IV, ya que estas, en dicha zona, presentaron los valores más altos de compuestos polifenólicos, particularmente de ADFs.

Al evaluar los efectos del año de siembra sobre las distintas muestras de trigo estudiadas (**Tabla 2.7**), se observa una influencia significativa de este en los compuestos **4**, **6**, **10** y **21** presentes en la FL y en el compuesto **16** de la FU de los extractos de trigo. Sin embargo, a grandes rasgos, no parece haber una gran interacción entre la variedad y el año de cosecha, esta sólo fue significativa para los compuestos derivados de FVA (**5**, **6** y **8**) en la FL y para el compuesto **7** presente en la FU.

Stracke *et al.* (2009), demostraron una variación en el contenido de compuestos fenólicos en variedades Suizas en distintos años de siembra. Más tarde, Zhang *et al.* (2012) encontraron que el contenido de ácidos fenólicos en la FL y en la FU de trigos procedentes de China estaba fuertemente influenciado por el genotipo, el año de siembra y la interacción entre ambos. También Fernandez-Orozco *et al.* (2010) encontraron diferencias en el contenido de polifenoles debido al lugar de siembra en 26 cultivos de trigo provenientes de Hungría, Francia, Reino Unido y Polonia.

Estos resultados demuestran que el contenido de polifenoles en el grano de trigo está influenciado por el genotipo al cual pertenecen y por el ambiente en el cual estos se desarrollan, sobre todos aquellos que se encuentran formando parte de la pared celular, uniendo covalentemente distintas macromoléculas, como ligninas, pentosanos, carbohidratos, etc. Estos compuestos son de especial importancia para la salud humana, ya que son capaces de resistir a las condiciones del sistema digestivo superior, absorbiéndose en el plasma sanguíneo durante la digestión por la microflora intestinal (Andreasen *et al.*, 2001).

Finalmente, la búsqueda de un genotipo con mayor contenido en compuestos polifenólicos, para promover el estudio de la base genética de los caracteres asociados a la generación de estos compuestos, implican no sólo conocer las características genéticas de un cultivo de trigo sino también, propiciarle un ambiente adecuado, que promueva la formación de estos compuestos.

2.4. CONCLUSIONES.

En esta parte de la tesis se estudió el contenido total y el perfil de compuestos polifenólicos, en 12 variedades de trigo (ACA 303, ACA 315, ACA 320, ACA 903 B, BUCK 75 ANIVERSARIO, Cronox, BIOINTA 3004, BAGUETTE PREMIUM 11, LE 2330, KLEIN CAPRICORNIO, KLEIN GUERRERO y KLEIN YARARÁ) procedentes de 4 zonas diferentes delimitadas por el INTA (SUB I, SUB IIN, SUB IV y SUB VN), en dos años de producción (2009 y 2010).

En una primera etapa, los compuestos polifenólicos fueron extraídos del grano de trigo en dos fracciones: la primera para extraer los polifenoles libres de la matriz, y la segunda para extraer los compuestos unidos a las macromoléculas constituyentes de la pared celular. Las fracciones obtenidas se identificaron como fracción libre (FL) y fracción unida (FU), respectivamente.

El contenido total de compuestos polifenólicos a través de la técnica de Folin-Ciocalteu fue determinado en ambas fracciones. Los resultados obtenidos mostraron que las variedades ACA 303, ACA 315, ACA 320 y ACA 903 B, tenían los valores significativamente ($p < 0,05$) más altos de PT en la FL, en la FU y en la FT (FL + FU). El resto de las variedades analizadas no mostraron diferencias significativas entre ellas en ninguna de las dos fracciones estudiadas.

Por otro lado se estudiaron los compuestos polifenólicos presentes en ambas fracciones. La identificación se realizó a través de HPLC-DAD-ESI-MS/MS (Q-TOF), y se lograron identificar 12 compuestos en la FL (3 AHB, 1 aminoácido, 3 FVA, 3 ADF, 1 AHC y 1 derivado de AHC) y 14 compuestos en la FU (9 ADF, 1 ATF, 3 AHC y 1 derivado de AHC). La cuantificación de cada uno de estos compuestos mostró que cada variedad de trigo estudiada presentaba un perfil característico de compuestos polifenólicos. Las variedades ACA 315 y KLEIN GUERRERO presentaron los valores más altos de ADF y ATF, los cuales se asocian al salvado de trigo. Estos compuestos son especialmente considerados en la bibliografía debido a que pueden resistir la digestión gastrointestinal para llegar al colon, donde ejercerían su poder antioxidante.

Finalmente se estudió la influencia del ambiente (zona + año) en el perfil de polifenoles, encontrando que la zona influye ampliamente en el perfil de la FU de polifenoles, sin embargo el año de siembra no parece influir considerablemente en este.



CAPÍTULO 3

***CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE TRIGOS DE
DISTINTO GENOTIPO Y PROCEDENCIA.***

3.1. INTRODUCCIÓN.

En los últimos años ha crecido el interés por el estudio de la capacidad antioxidante de extractos de plantas medicinales y de alimentos debido a que la producción de radicales libres está fuertemente asociada a una gran variedad de enfermedades como así también al proceso de envejecimiento. En este sentido, se ha definido en el contexto de un sistema biológico a un antioxidante como, “una molécula que, cuando está presente en pequeñas concentraciones en relación a un sustrato oxidable puede prevenir, reducir o retrasar la destrucción oxidativa de biomoléculas” (Halliwell & Gutteridge, 1995). Debido a esto, actualmente son de gran interés las propiedades funcionales de los alimentos, y en particular la acción antioxidante de los mismos por la protección que brindan a los organismos vivos frente al daño oxidativo de células y tejidos.

El daño o “estrés oxidativo” se ha definido como un desequilibrio en el estatus antioxidante/oxidante del cuerpo humano debido al incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), especies reactivas de nitrógeno (ERNs) y especies reactivas de azufre (ERSs). Estas especies reactivas pueden dañar o destruir la función de otras macromoléculas, como por ejemplo lípidos de membranas celulares (peroxidación lipídica), proteínas, enzimas, ácido desoxirribonucleico (ADN) y pueden llevar incluso a la muerte celular (apoptosis) (Liu, 2002).

Dentro de las especies reactivas del oxígeno se encuentran los radicales libres anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroperoxilo (HO_2^{\cdot}), radical hidroxilo (HO^{\cdot}), óxido nítrico (NO), y otras especies como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete (1O_2) y ácido hipocloroso (HOCl). Por otro lado, las especies reactivas de nitrógeno derivan de la reacción entre NO y O_2^- para formar peroxinitrito ($ONOO^-$) y las especies reactivas de azufre son fácilmente formadas por la reacción de EROs con tioles (Carocho & Ferreira, 2013).

Todas las EROs son generadas a partir de oxígeno molecular (O_2). Un organismo aerobio no puede vivir sin oxígeno, sin embargo altas concentraciones de este causan en el mismo organismo lesiones irreversibles.

El O_2 presenta en su estado basal, dos electrones desapareados, con sus espines paralelos, en diferentes orbitales. Esta característica le permite ser un buen oxidante (se reduce captando electrones de la molécula que oxida), por lo que la formación de EROs tiene lugar a través de reacciones de óxido-reducción, o bien por absorción de energía electromagnética. En la **Figura 3.1** se muestra la generación de distintas EROs a partir de O_2 .

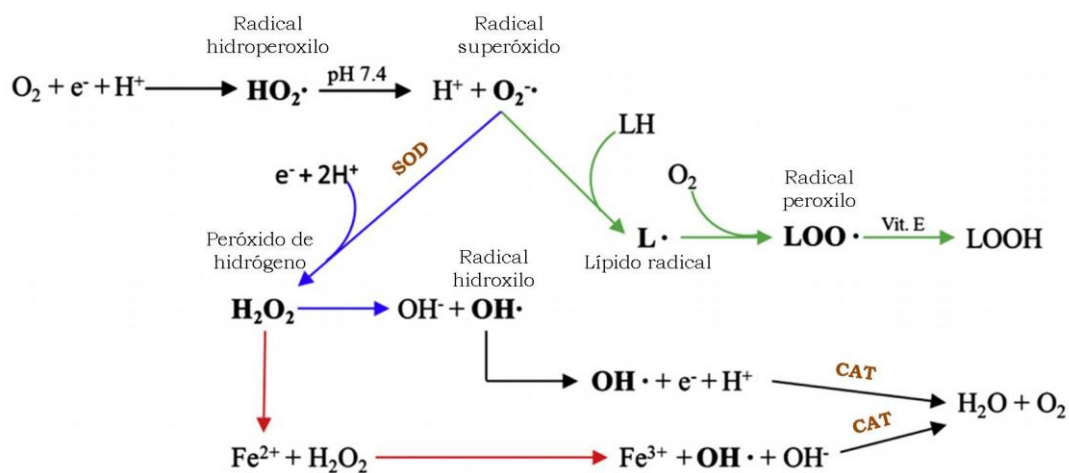


Figura 3.1. Generación de EROs. Las flechas verdes representan la peroxidación lipídica, las flechas azules representan la reacción de Haber-Weiss y las flechas rojas corresponden a la reacción de Fenton. SOD se refiere a la enzima superóxido dismutasa y CAT a la enzima catalasa. Adaptado de Carochó & Ferreira (2013).

Con respecto a ERNs, la reacción que tiene lugar es $\text{NO}\cdot + \text{O}_2\cdot^- \rightarrow \text{ONOO}^-$, y ERSs se generan en condiciones oxidativas de tioles para formar un disulfuro que, con oxidación fuerte, puede resultar en monóxido-S-disulfuro o dióxido-S-disulfuro como intermediario molecular. Finalmente una reacción con un tiol reducido puede resultar en la formación de sulfénico o ácido sulfinico (Giles *et al.*, 2001).

Estas especies reactivas se forman constantemente en el organismo y juegan un rol crucial en una variedad de funciones fisiológicas. Se estima que las mitocondrias constituyen la principal fuente sub-celular de EROs durante el proceso de obtención de energía. Estas especies también son generadas por células fagocíticas en reacciones inflamatorias controladas, que liberan oxidantes con el objetivo de destruir células infectadas por bacterias o virus, formando parte de la defensa inmunitaria del organismo. Por otra parte, el hombre está sometido permanentemente a la acción de radicales libres externos por exposición a diferentes factores ambientales, como radiaciones ionizantes, rayos UV, tabaco (genera ERNs), radiación gamma, aerosoles químicos, etc. (Elsayed, 2001). La generación en exceso de estas especies reactivas conduce al estrés oxidativo de las células.

Las bio-moléculas más afectadas por la superproducción de EROs, ERNs y ERSs son las proteínas, las moléculas de ADN y ácido ribonucleico (ARN), carbohidratos y lípidos. Los radicales libres tienen dos mecanismos diferentes de reacción cuando reaccionan con macromoléculas: donación de un electrón, reduciendo radicales; y aceptación de un electrón, a través de la oxidación de radicales, abstracción de un hidrógeno, reacciones de adición, reacciones de auto aniquilación y desproporción (Slater, 1984). Estas reacciones

llevan a la producción de EROs, ERNs y ERSs las cuales han sido ligadas a muchas enfermedades severas como cáncer, enfermedades cardiovasculares como aterosclerosis y derrames cerebrales, desórdenes neurológicos, desórdenes renales, desórdenes hepáticos, hipertensión, artritis reumatoidea, síndromes respiratorios dolorosos en adultos, enfermedades de deficiencia auto-inmune, inflamación, desórdenes degenerativos asociados con la edad, diabetes mellitus, complicaciones diabéticas, cataratas, obesidad, autismo, enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington, vasculitis, úlceras gástricas y hemocromatosis, entre otros (Lobo *et al.*, 2010; Lü *et al.*, 2010; Rahman, 2007; Singh *et al.*, 2010).

Los organismos aerobios han desarrollado mecanismos de defensa para neutralizar la acción de los radicales libres que, en pequeñas cantidades, se están produciendo continuamente en el metabolismo. Un ejemplo lo constituye la acción de la enzima citocromo oxidasa del sistema de transporte electrónico mitocondrial, que actúa como sumidero retirando el oxígeno que, de otra manera, podría ser convertido en EROs. Las células además disponen de un complejo sistema antioxidante para contrarrestar el efecto de los radicales libres, el cual puede ser dividido en dos grandes grupos: antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos (vitamina A, coenzima Q10, ácido úrico y glutatión). A su vez, los antioxidantes enzimáticos se dividen en defensas enzimáticas primarias (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) y secundarias (glutatión reductasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa). En la **Figura 3.2** se muestra un esquema que resume la acción del sistema de defensa antioxidante enzimático.

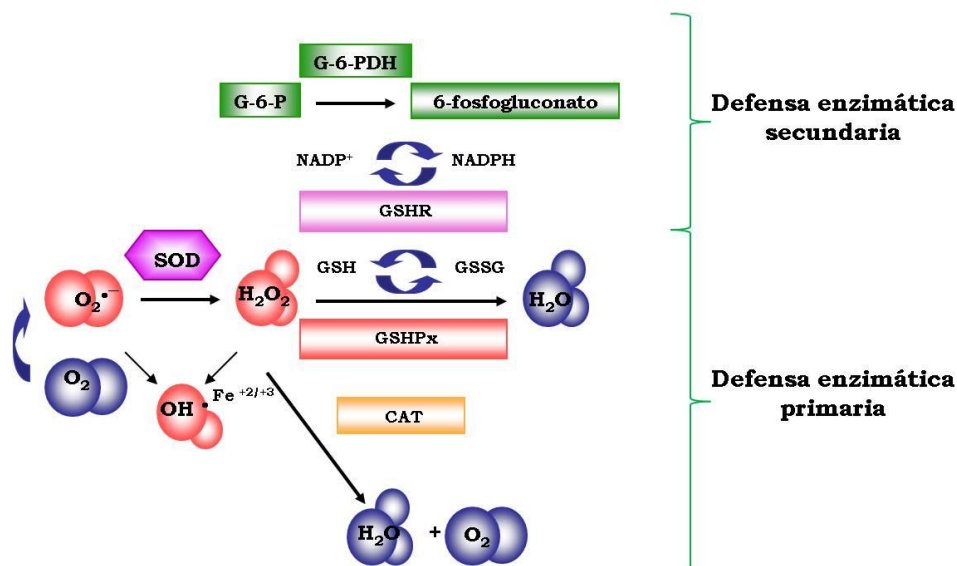


Figura 3.2. Sistema de defensa antioxidante enzimático. Glutatión peroxidasa (GSHPx), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) como defensa antioxidante enzimática primaria y, glutatión reductasa (GSHR) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH) como defensa enzimática secundaria. Adaptado de Monferrán (2006).

Un antioxidante puede intervenir previniendo la formación de radicales libres; captando radicales libres que inician un proceso oxidativo, interfiriendo en el proceso de propagación; o bien estar involucrados en la reparación del proceso de oxidación.

Para que un antioxidante sea efectivo, en su estructura debe tener sustituyentes donadores de electrones o hidrógenos con potenciales de reducción apropiados para reducir al radical libre; capacidad de deslocalizar el electrón tomado del radical libre, de forma tal de que el nuevo radical sea estable frente a una nueva oxidación; y la capacidad de acomplejar metales de transición implicados en el proceso de oxidación.

Igualmente importante es la accesibilidad que tienen los antioxidantes para llegar al lugar de acción (lipofilicidad o hidrofiliicidad) y las interacciones que pueden ocurrir entre antioxidantes.

En situaciones de estrés oxidativo el sistema de defensa antioxidantes endógeno no es suficiente para contrarrestar el efecto de los radicales libres, por lo que es necesario reforzarlo con antioxidantes exógenos para mantener las concentraciones de EROs, ERNs y ERSs a niveles bajos (Pietta, 2000).

Los seres humanos incorporan antioxidantes exógenos a través de los alimentos que ingieren. Las principales fuentes de antioxidantes son las frutas y verduras, seguidas de los cereales, y en general esta propiedad viene dada por su contenido en compuestos polifenólicos, los cuales poseen elevada actividad antioxidante (Rice-Evans, 2001; Scalbert *et al.*, 2005). Por esta razón, en la actualidad se trabaja en la búsqueda de alimentos naturales ricos en estos compuestos y en la evaluación de estas propiedades antioxidantes.

En la actualidad existen numerosas técnicas para estudiar las propiedades antioxidantes de los alimentos. Además de las metodologías tradicionales utilizadas para evaluar la capacidad antioxidante de un compuesto puro o extracto, como el monitoreo de la oxidación de lípidos, la formación de dienos conjugados y la medición de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), se ha adoptado el uso de compuestos radicales coloreados, debido a que brindan sencillez, rapidez, bajo costo y buena reproducibilidad (Brand-Williams *et al.*, 1995; Re *et al.*, 1999). Ejemplos de estos los constituyen los métodos TEAC (capacidad antioxidante equivalente al Trolox) que evalúa la capacidad de captación del radical catión ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) y FRAP (poder antioxidante de reducción del ión férrico) que mide la capacidad de un antioxidante para donar electrones y reducir el ión férrico a ferroso.

Estos métodos químicos *in vitro* han sido ampliamente utilizados para determinar la capacidad antioxidante en un gran número de alimentos. Sin embargo, los resultados obtenidos no pueden ser claramente aplicados a los sistemas vivos, debido a que el efecto real de un compuesto en células y organismos está afectado por problemas de permeabilidad, absorción a través de membranas, distribución en diferentes órganos y tejidos, reacciones con biomoléculas, etc., y efectos secundarios de los productos de sus reacciones con los oxidante y su metabolismo. Es por ello que los ensayos *in vivo* son

necesarios para una evaluación más precisa de la potencialidad de un nuevo compuesto o extracto como agente antioxidante (Bednarska *et al.*, 2008).

Dentro de los métodos *in vivo*, la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, es un modelo eucariota ampliamente utilizado para el estudio del estrés oxidativo, debido a que es capaz de responder a cambios redox intracelulares a través de la inducción de genes o estímulos cuyos productos actúan para mantener el ambiente redox celular (Dani *et al.*, 2008; Herrero *et al.*, 2008). Además, existe una alta conservación de los mecanismos moleculares de defensa entre el hombre y la levadura. Cerca del 30% de los genes asociados a enfermedades en el hombre concuerdan con genes en la levadura, los cuales pueden ser fácilmente manipulados con técnicas simples de biología molecular. Esto permite el estudio de los mecanismos moleculares asociados con mecanismos de envejecimiento celular y la defensa tras la exposición a estrés oxidativo (Herrero *et al.*, 2008). La levadura detecta el estrés oxidativo y genera una respuesta a nivel celular y molecular, induciendo los sistemas de defensa antioxidantes (Costa & Moradas-Ferreira, 2001). En respuesta a este estrés, se activan vías de señalamiento intracelular y factores de transcripción específicos, que aumentan la expresión de genes que codifican para la síntesis de proteínas (enzimas) antioxidantes. Esta respuesta específica tiene como función disminuir los niveles de EROs así como reparar los daños producidos por estos oxidantes.

El trigo ha demostrado ser un cereal rico en compuestos polifenólicos, incluso comparable a frutas y verduras (Adom & Liu, 2002; Liu, 2007) (**Capítulo 2, Figura 2.6**). También, numerosas investigaciones demostraron que este cereal tiene propiedades antioxidantes cuando éstas se evalúan a través de ensayos químicos *in vitro* (Adom *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2006; Narwal *et al.*, 2012; Okarter *et al.*, 2010). Sin embargo, poco se conoce sobre el verdadero efecto que estos antioxidantes poseen, es muy escasa la información reportada sobre el poder antioxidante *in vivo* y los mecanismos de acción a nivel celular de una mezcla de estos compuestos inmersos en una matriz tan compleja como la de un alimento, en donde el poder antioxidante está influenciado por la combinación aditiva, sinérgica, o antagónica de dichos compuestos, sumado a los efectos de matriz. En este sentido, el presente trabajo busca estudiar la acción antioxidante de distintas variedades de trigo argentinas utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*. Por un lado se pretende brindar nuevas alternativas que permitan apuntalar su valor sobre la base de un mejor conocimiento de sus cualidades nutricionales, por otro lado se busca un aporte novedoso al conocimiento de la acción que los alimentos ricos en antioxidantes tendrían sobre sistemas biológicos, como una manera de predecir posibles respuestas en humanos que consuman tales alimentos. Esto constituye un punto de avance interesante en la ciencia de los alimentos, planteando modelos de estudio que emerjan de lo meramente empírico y avancen en el estudio de los mecanismos involucrados en los cambios observados.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.2.1. Estándares y reactivos.

Para la determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* se utilizó ABTS (sal diamónica del ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)), TPTZ (2, 4, 6-tripiridil-S-triazina), peróxido de hidrógeno 30 % p/p y Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxílico) de Sigma Aldrich (Suiza). El persulfato de potasio fue de Fluka (Dorset, Reino Unido) y el Cloruro férrico hexahidratado de Carlo-Erba.

Para la determinación de la capacidad antioxidante *in vivo* se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC36900 (American Type Culture Collection). El H₂O₂ utilizado fue de calidad suprapur de Merck (Alemania). El agar-agar, extracto de levadura y peptona de carne fueron obtenidos de Laboratorio Britania (Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina).

El agua utilizada para las determinaciones fue ultra pura (< 5 µg/L TOC), obtenida de un sistema de purificación Arium 61316-RO acoplado a un sistema Arium 611-UV (Sartorius, Alemania).

3.2.2. Muestras.

Las muestras utilizadas en este trabajo fueron las mismas que se usaron para el estudio del perfil de compuestos polifenólicos (**Capítulo 2, Sección 2.2.2**).

3.2.3. Extracción de polifenoles.

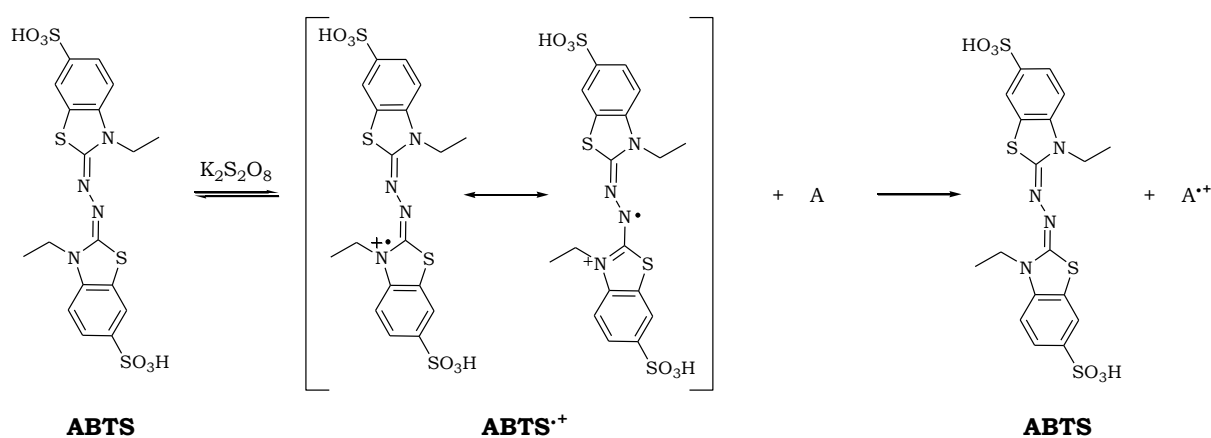
Los extractos utilizados para determinar la capacidad antioxidante fueron los mismos que se usaron para determinar el perfil de compuestos polifenólicos (**Capítulo 2, Sección 2.2.3**).

3.2.4. Determinación de la capacidad antioxidante *in vitro*.

La capacidad antioxidante (CA) *in vitro* se midió a través de los métodos TEAC (capacidad antioxidante equivalente a Trolox) y FRAP (poder antioxidante de reducción del ión férrico) y los resultados se expresaron en relación a la CA del Trolox, un análogo hidrosoluble de la vitamina E.

3.2.4.1. Capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC).

Este método fue originalmente diseñado por Rice-Evans & Miller (1994), basándose en la reducción *in situ* del radical ferrilmioglobina con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en presencia del precursor ABTS, para producir el radical catión $ABTS^{\bullet+}$. Actualmente existen variaciones en la generación del $ABTS^{\bullet+}$, que consisten en hacer reaccionar el ABTS con dióxido de manganeso, persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) o ABAP (2,2'-azo-bis-(2-amidinopropano)) (Prior, Wu, & Schaich, 2005). TEAC mide la capacidad de un compuesto para captar el radical coloreado $ABTS^{\bullet+}$, convirtiendo el mismo en un producto decolorado (**Esquema 3.1**) (Arts *et al.*, 2003).



Esquema 3.1. Reacción del ensayo TEAC. A es un compuesto antioxidante.

Este radical tiene un espectro de absorción característico, con máximos a 414, 645, 734 y 815 nm y posee una coloración verde-azulada. Químicamente es muy estable y es muy soluble en medio acuoso y etanólico. La reacción es independiente del pH y la disminución de la concentración de $ABTS^{\bullet+}$ es linealmente dependiente de la concentración de antioxidantes presentes en la muestra (Prior *et al.*, 2005).

La desventaja que presenta este método es que el radical utilizado no se encuentra en muestras biológicas, con lo cual no tiene importancia fisiológica. Sin embargo, una ventaja es que la generación del radical se produce antes de la adición de la muestra. Esto evita que los componentes de la misma puedan reaccionar con los reactivos. Por otro lado, este método es aplicable al estudio de antioxidantes tanto hidrosolubles como liposolubles, de compuestos puros y de extractos de alimentos (Awika *et al.*, 2003), y se puede utilizar para estudiar el efecto del pH sobre los mecanismos antioxidantes (Lemanska *et al.*, 2001).

↳ **Procedimiento.**

La metodología utilizada en este trabajo es una variante del método original, propuesta por Re *et al.* (1999) en el que el ABTS^{•+} se genera directamente a través de la reacción con persulfato de potasio, y de la aplicación propuesta por Lopez-Martinez *et al.* (2009).

El ABTS^{•+} se preparó diariamente mezclando 10 mL de una solución de ABTS 7 mM en agua ultra pura, con 6,7 mg de K₂S₂O₈. A esta solución se la protegió de la luz y se la dejó estabilizar durante 12-16 h a temperatura ambiente antes de ser utilizada. Luego se preparó el reactivo de trabajo diluyendo el ABTS^{•+} con metanol hasta una absorbancia de $0,80 \pm 0,02$, a una longitud de onda de 734 nm y a una temperatura de 25°C.

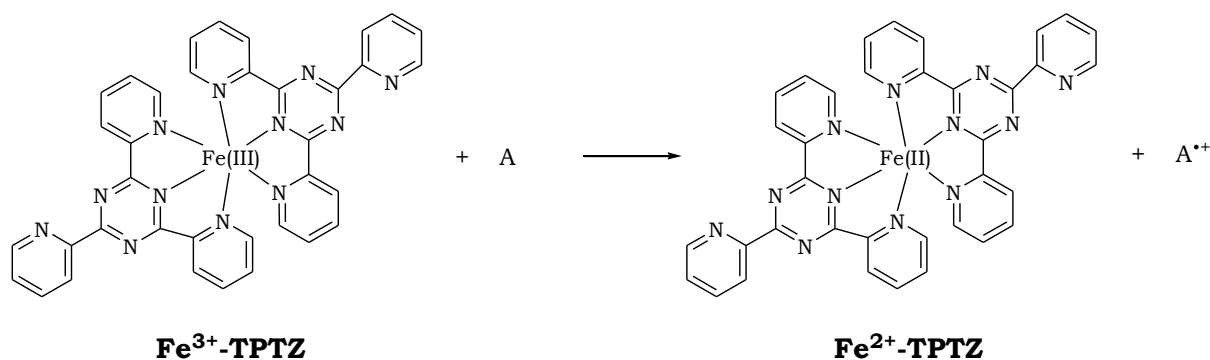
Para la determinación de las muestras se colocaron 3 mL de reactivo de trabajo y 95 µL de metanol en un tubo de Khan y se añadieron 5 µL de la FL o FU de los extractos de trigo. La mezcla obtenida se agitó y se dejó reposar a temperatura ambiente por 30 min. Finalmente se midió la absorbancia de la solución a 734 nm (A₁) contra un blanco procesado de la misma forma, de absorbancia A₀, en el cual la muestra fue reemplazada por el solvente de dilución. Todas las muestras y los blancos fueron ensayados por triplicado y se calculó la absorbancia de cada muestra a través de la diferencia (Δ Abs) de A₀ - A₁.

La capacidad antioxidante de cada muestra se determinó extrapolando su Δ Abs en una curva de calibración de Trolox. El rango de linealidad utilizado fue de 0 a 20,8 µM y los estándares se procesaron diariamente por triplicado de la misma forma que las muestras.

Los resultados obtenidos se expresaron como mili moles equivalentes de Trolox en 100 g de muestra seca (mmoles ET/100g).

3.2.4.2. Poder antioxidante de reducción del ion férrico (FRAP).

El método FRAP, introducido por Benzie & Strain (1996) para medir la capacidad antioxidante total en plasma, se basa en la capacidad que presentan los compuestos antioxidantes presentes en la muestra para reducir, por transferencia electrónica, el ión férrico (Fe³⁺) a ferroso (Fe²⁺) en medio acuoso ácido (pH = 3,6). Esta reacción mide la reducción de 2,4,6,-tripiridil-s-triazina (TPTZ) a un producto coloreado con un máximo de absorbancia a 593 nm (**Esquema 3.2**).



Esquema 3.2. Reacción del ensayo FRAP. A es un compuesto antioxidante.

La reacción detecta compuestos con potenciales de reducción menores a 0,7 V, tal que este método es útil para un *screening* de la capacidad para mantener el estatus redox en células y tejidos. El poder de reducción está relacionado al grado de hidroxilación y conjugación en los polifenoles (Pulido *et al.*, 2000). Este método no detecta compuestos que actúan por transferencia de H, particularmente tioles y proteínas (Prior *et al.*, 2005).

La reacción que tiene lugar en este ensayo es pH dependiente y el aumento de la concentración de Fe²⁺-TPTZ es linealmente dependiente de la concentración de antioxidantes presentes en la muestra.

La desventaja que presenta este método es que solo mide la capacidad de reducción del ión férrico, lo cual no es relevante desde el punto de vista fisiológico. No obstante, comparado con otros ensayos, es un método rápido, simple, robusto y económico y no requiere equipamientos muy especializados (Prior *et al.*, 2005).

↳ **Procedimiento.**

La metodología utilizada en este trabajo fue la descrita por Benzie & Strain (1996) con algunas modificaciones. Diariamente se preparó el reactivo de trabajo, que consiste en una mezcla de buffer acetato 300 mM (NaC₂H₃O₂ – C₂H₄O₂ a pH = 3,6), TPTZ 10 mM en HCl 40 mM y tricloruro férrico (FeCl₃.6H₂O) 20 mM en una proporción 10:1:1.

Para la determinación de las muestras se colocaron 3 mL de reactivo de trabajo y 95 µL de metanol en un tubo de Khan y se añadieron 5 µL de la FL o FU de los extractos de trigo. La mezcla obtenida se agitó y se dejó reposar a temperatura ambiente por 30 min. Finalmente se midió la absorbancia de la solución a 593 nm (A₁) contra un blanco procesado de la misma forma, de absorbancia A₀, en el cual la muestra fue reemplazada por el solvente de dilución. Todas las muestras y los blancos fueron ensayados por triplicado y se calculó la absorbancia de cada muestra a través de la diferencia (ΔAbs) de A₁ - A₀.

La capacidad antioxidante de cada muestra se determinó extrapolando su Δ Abs en una curva de calibración de Trolox. El rango de linealidad utilizado fue de 0 a 20,8 μ M y los estándares se procesaron diariamente por triplicado de la misma forma que las muestras.

Los resultados obtenidos se expresaron como mili moles equivalentes de Trolox en 100 g de muestra seca (mmoles ET/100g).

3.2.5. Determinación de la capacidad antioxidante *in vivo*. Ensayo de sobrevida en la levadura *S. cerevisiae*.

Se trabajó con una cepa control de levadura *S. cerevisiae*, la cual se conservó en medio nutritivo líquido YPD (1 % de extracto de levadura, 2 % de peptona y 2 % de glucosa) a -80°C hasta el momento de su utilización.

En este estudio se evaluó la capacidad de los extractos de trigo, tanto de la FL como de la FU, de atenuar el estrés oxidativo inducido por el oxidante H_2O_2 en la cepa control de levadura.

En primer lugar se aclimataron las levaduras en medio YPD por 16 h a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en un agitador orbital de KLINE (VICKING) a 150 rpm. Las levaduras aclimatadas se diluyeron con medio líquido de YPD hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm ($\text{Abs}_{600\text{nm}}$) de 0,2-0,3, y se incubaron por 3 h a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ con agitación (150 rpm) hasta llegar a fase exponencial de crecimiento ($\text{Abs}_{600\text{nm}} = 0,5-0,7$). Luego, se diluyeron nuevamente en medio líquido de YPD fresco hasta $\text{Abs}_{600\text{nm}} = 0,2$. En cada pocillo (*well*) de una placa de 24 pocillos CELLSTAR de greiner, se transfirieron 600 μ L de la levadura y se evaluaron 4 tratamientos:

- I- un control negativo de las levaduras sin ningún tipo de exposición;
- II- un control de levaduras expuesto a las FL y FU de los extractos;
- III- un control positivo de levaduras expuestas sólo a H_2O_2 ;
- IV- exposición de las levaduras a las FL y FU de los extractos más el agregado del H_2O_2 .

El volumen final de cada pocillo fue de 700 μ L. En los tratamientos II y IV se agregaron 10 μ L de extracto de trigo (FL o FU) incubando por 15 min a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Inmediatamente se agregó el oxidante (20 μ L de H_2O_2) y se incubó durante 1 h a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ con agitación a 150 rpm. El volumen final (700 μ L) en cada pocillo en los 4 tratamientos se alcanzó con el agregado de medio líquido YPD.

Para la evaluación de la sobrevida de la levadura frente a la exposición de oxidante/extracto, el contenido de cada pocillo se diluyó 1000 veces con agua esterilizada en una frasco de 50 mL de color caramelo. Luego se tomaron 80 μ L de esta dilución y se sembraron en medio sólido de YPD (YPD con 2 % de agar) incubando durante 72 h a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Finalmente se realizó el recuento de las colonias expresando los resultados como % de sobrevida, siendo el 100 % de sobrevida el número de colonias observadas en las placas del

tratamiento I (Baroni *et al.*, 2012). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado en una misma placa, y al menos se ensayaron 3 placas por cada tratamiento en distintos días.

La concentración final de H₂O₂ en cada pocillo fue de 2,5 mM. Esta concentración permitió un % de sobrevivencia de la levadura menor al 50 %.

Debido a que el metanol es un solvente orgánico tóxico para la levadura, los extractos se secaron bajo corriente de N₂ y se reconstituyeron en DMSO. La concentración óptima de trabajo de cada extracto se determinó en ensayos previos donde la levadura fue expuesta a distintas concentraciones del mismo. La concentración elegida fue aquella que no resultó citotóxica por sí misma para la levadura y la que mejoró la tasa de sobrevivencia de las levaduras expuestas al H₂O₂.

3.2.6. Tratamiento estadístico de los datos.

Los programas utilizados para la interpretación de los resultados generados en esta parte de la tesis fueron el paquete **InfoStat** (Di Rienzo *et al.*, 2008) y **RStudio** Versión 0.98.953 – © 2009-2013 de RStudio, Inc.

Se utilizó el análisis de la varianza para comparar los resultados de capacidad antioxidante en las distintas variedades de trigo analizadas, como así también para las variaciones climáticas (zona y año de cultivo), utilizando el mismo procedimiento que se describió en el **Capítulo 1, Sección 1.2.6**.

Para estudiar la relación entre el contenido de PT y la capacidad antioxidante del trigo argentino se utilizó el análisis de correlación simple de Pearson (ACSP) (**Anexo I, Sección 1.3.1.1**). Para estudiar la relación entre el perfil de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante, se utilizó el análisis de correlación canónica (**Anexo I, Sección 1.3.3.1**) y el análisis de boosted regression trees (BRT) (**Anexo I, Sección 1.3.3.2**). Para los BRT, se construyeron modelos para cada método evaluado de CA por cada fracción de extracto, utilizando la biblioteca gbm (Ridgeway, 2013) en R. Los ajustes de los modelos se hicieron por validación cruzada (VC). En la VC la función selecciona una fracción de los datos proporcionados, de acuerdo a los parámetros ajustados, para construir un modelo. Este último se valida con la fracción de datos restantes lo que permite evaluar y confirmar la calidad predictiva del modelo construido (Elith *et al.*, 2008).

Se ajustaron 3 parámetros para maximizar el rendimiento de cada modelo: la proporción de datos seleccionados al azar para cada árbol del proceso de VC (*bag fraction*), la contribución de cada árbol para construir el modelo (*learning rate*) y el número de interacciones en cada árbol (*tree complexity*). La calidad del modelo se evaluó usando la correlación de VC (la correlación entre lo predicho y los primeros datos aplazados del modelo). La importancia de las variables predictoras se evaluó usando una rutina (*script*) en 'gbm' que calcula la contribución de cada variable al modelo, promediando el número de veces que la variable es seleccionada en los modelos simples (árboles de regresión) (Elith *et*

al., 2008). La influencia relativa (o contribución) de cada variable es escalada de modo que la suma de todas sea igual a 100 %, siendo las variables predictoras más importantes, aquellas que muestran mayor contribución.

3.3. DESCRIPCIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

A continuación se muestran los resultados obtenidos de la capacidad antioxidante *in vitro* e *in vivo* de las dos fracciones, FL y FU, de extractos de trigo obtenidas. La CA *in vitro* se midió a través de los métodos TEAC y FRAP, mientras que la CA *in vivo* fue determinada utilizando una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Adicionalmente, se estudiaron variaciones ambientales (zona de cultivo y años de siembra) en la CA para determinar si los resultados encontrados estaban influenciados por la interacción genotipo-ambiente.

Finalmente, a través de estadística multivariada se estudió si el perfil de compuestos polifenólicos podía explicar la CA encontrada en las distintas variedades de trigo.

3.3.1. Evaluación de la capacidad antioxidante en distintas variedades de trigo.

3.3.1.1. Métodos químicos *in vitro*.

La CA *in vitro* fue analizada en la fracción libre (FL) y en la fracción unida (FU) de los extractos de trigos, en las 12 variedades estudiadas en cuatro zonas delimitadas por el INTA. La misma se evaluó por dos métodos, TEAC y FRAP, debido a que estos evalúan diferentes mecanismos de acción (captación de radicales libres y reacción redox $Fe^{+3} \rightarrow Fe^{+2}$, respectivamente).

En la **Figura 3.3** se muestran los resultados obtenidos de TEAC para la FL y la FU de las 12 variedades de trigo analizadas. También se muestra el valor total (FL + FU) de la CA medida a través de TEAC, la cual se identificará como FT. Los resultados se expresaron en mmoles equivalentes de Trolox (ET) por cada 100 g de peso seco de muestra.

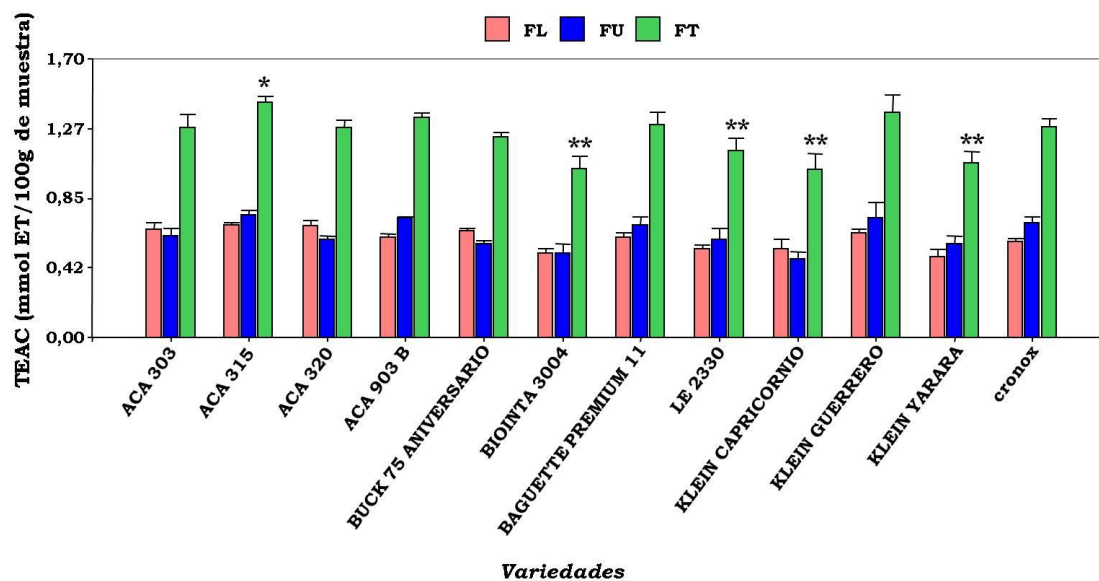


Figura 3.3. Capacidad antioxidante evaluada a través del método TEAC para 12 variedades distintas de trigo. En la FT, * significa estadísticamente ($p < 0,05$) superior al resto, mientras que ** significa estadísticamente ($p < 0,05$) inferior al resto.

Los valores obtenidos de TEAC en la FL mostraron un rango entre $0,69 \pm 0,07$ mmol ET/100g y $0,49 \pm 0,12$ mmol ET/100g de muestra, para las variedades ACA 315 y KLEIN YARARÁ, respectivamente. Por otro lado la FU de extractos de trigo presentó una variación en la CA medida a través de TEAC de $0,75 \pm 0,07$ mmol ET/100g para la variedad ACA 315 a $0,48 \pm 0,11$ mmol ET/100g para la variedad KLEIN CAPRICORNIO. En cuanto a la CA en la FT, esta presentó valores entre $1,44 \pm 0,16$ mmol ET/100g y $1,02 \pm 0,26$ mmol ET/100g para las variedades ACA 315 y KLEIN CAPRICORNIO, respectivamente.

La variedad ACA 315 mostró los valores más altos de CA en la FL, la FU y en la FT de extractos de trigos, sin embargo sólo se diferenció significativamente ($p < 0,05$) del resto en la FT. Por otro lado, las variedades BIOINTA 3004, LE 2330, KLEIN YARARÁ y KLEIN CAPRICORNIO presentaron los valores más bajos de CA en las tres fracciones analizadas, diferenciándose significativamente del resto en la FL y en la FT.

Estos resultados fueron más altos que los reportados por Hung *et al.* (2009), quienes encontraron valores de $0,047$ mmol ET/100g en la FL de trigos provenientes de Japón y de $0,26$ mmol ET/100g en la FU de los mismos. Sin embargo otros autores reportaron valores más altos de la CA, a través del método TEAC, en la FL de extractos de trigo, Yu *et al.* (2003) encontraron valores promedio de $2,6$ mmol ET/100g de muestra procedentes de Colorado, Estados Unidos, mientras que Moore *et al.* (2005), encontraron valores promedio de $1,6$ mmol ET/100g en muestras provenientes de 8 genotipos distintos de Maryland, Estados Unidos. De todos modos, la comparación de los resultados obtenidos en este trabajo con los obtenidos por otros autores es difícil, sobre todo por la variabilidad metodológica presente en la bibliografía consultada.

Por otro lado, la FL de los extractos obtenidos en esta tesis contribuyó con el 47,5 % de la capacidad antioxidante total encontrada en las distintas variedades de trigo estudiadas a través del método TEAC, mientras que la FU contribuyó con el 52,5 % restante. Estos resultados difieren de los encontrados por Hung *et al.* (2009). Ellos encontraron que la FL de los extractos de trigo analizados representaba sólo el 15 % de la capacidad antioxidante total. Estas diferencias probablemente se deban a los distintos métodos de extracción empleados. En este trabajo la FL se extrajo con una mezcla de acetona/agua (8:2), mientras que los autores antes mencionados realizaron la extracción de la FL con etanol/agua (8:2). Zhou & Yu (2004), demostraron que la extracción de polifenoles, en salvado de trigo, con 50 % de acetona mostraba mayor CA que aquellas realizadas con 70 % de etanol.

La **Figura 3.4** muestra los resultados obtenidos de FRAP para la FL, la FU y la suma de estas dos (FT) en las 12 variedades de trigo analizadas. Los resultados se expresaron en mmoles equivalentes de Trolox (ET) por cada 100 g de peso seco de muestra.

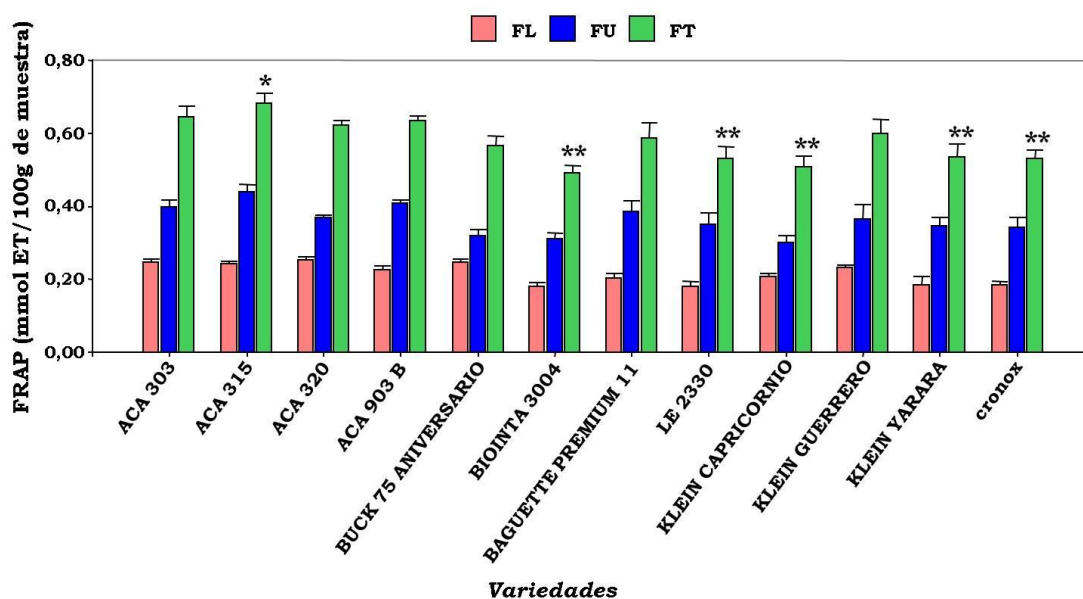


Figura 3.4. Capacidad antioxidante evaluada a través del método FRAP para 12 variedades distintas de trigo. En la FT, * significa estadísticamente ($p < 0,05$) superior al resto, mientras que ** significa estadísticamente ($p < 0,05$) inferior al resto.

La FL de los extractos de trigo estudiados mostró valores de CA, determinados a través del método FRAP, en un rango entre $0,25 \pm 0,04$ mmol ET/100g de muestra para la variedad ACA 320, y $0,18 \pm 0,04$ mmol ET/100g para la variedad LE 2330, mientras que la FU presentó una variación en la CA de $0,44 \pm 0,08$ mmol ET/100g para la variedad ACA 315 a $0,30 \pm 0,05$ mmol ET/100g para la variedad KLEIN CAPRICORNIO. En cuanto a la CA en

la FT, esta presentó valores entre $0,68 \pm 0,10$ mmol ET/100g para la variedad ACA 315 y $0,49 \pm 0,07$ mmol ET/100g para la variedad BIOINTA 3004.

Entre las 12 variedades estudiadas, ACA 315 mostró los valores más altos de CA en la FU y en la FT de extractos de trigos. Por otro lado, entre las variedades que presentaron los valores significativamente menores de CA a través de FRAP, destacan las variedades BIOINTA 3004 y KLEIN CAPRICORNIO.

Estos resultados presentan el mismo orden de magnitud que los encontrados por Alvarez-Jubete *et al.* (2010) en la FL de extractos de trigos Irlandeses (0,35 mmol ET/100g de muestra), sin embargo difieren considerablemente de los reportados por Siebenhandl *et al.* (2007). Ellos encontraron valores de $1,82 \pm 0,15$ mmol equivalente de Fe^{2+} /100g en la FU de extractos de trigo integral. Al igual que para la determinación de la CA a través de TEAC, la comparación de los resultados obtenidos en este trabajo con los obtenidos por otros autores es difícil, debido a la variabilidad metodológica reportada.

La FL de los extractos analizados contribuyó con el 37 % de la CA total (FT) determinada a través de FRAP, mientras que la FU contribuyó con el 63 % restante. No hemos encontrado trabajos que midan la CA a través de FRAP en ambas fracciones.

Analizando ambos métodos (TEAC y FRAP) para determinar la CA *in vitro*, encontramos que las 12 variedades de trigo estudiadas muestran acción antioxidante, sin embargo, la variedad ACA 315 se diferenció significativamente del resto, presentando los valores más altos de TEAC y FRAP en la FT de los extractos estudiados, 1,44 mmol ET/100g y 0,68 mmol ET/100g, respectivamente. Por otro lado, las variedades BIOINTA 3004 y KLEIN CAPRICORNIO mostraron los valores más pequeños de CA en los dos métodos empleados. Estos resultados muestran similitud con los analizados en el capítulo anterior, donde la variedad ACA 315 logró diferenciarse de BIOINTA 3004, KLEIN CAPRICORNIO y LE 2330 en el contenido de polifenoles totales y en compuestos principalmente derivados de ácido ferúlico, por lo que podemos pensar que existe una estrecha relación entre la CA y el perfil de compuestos polifenólicos. En la **Sección 3.3.2** se abordará este punto.

Al igual que los resultados encontrados para los distintos compuestos polifenólicos presentes en los extractos de trigo, el estudio de la CA *in vitro* también demostró una fuerte influencia del genotipo (variedad), sin embargo, algunos autores confirmaron que el medio ambiente y las condiciones de cultivo, también afectan a la CA determinada a través de TEAC, DPPH, ORAC, entre otros (Moore *et al.*, 2006)(Lv *et al.*, 2013; Moore *et al.*, 2006; Zhou & Yo, 2004).

Para estudiar si la zona de cultivo afecta la CA *in vitro* a través de TEAC y FRAP, en las variedades de trigo evaluadas en este estudio, se realizó un análisis de la varianza teniendo en cuenta la variedad (V), la zona de cultivo (Z) y la interacción entre estas dos (V x Z). En la **Tabla 3.1** se muestran los valores del estadístico F, junto con el grado de significancia, obtenido para cada uno de los métodos en las dos fracciones estudiadas (FL y FU).

Tabla 3.1. Estadístico F para un análisis combinado de la varianza para los valores obtenidos de CA *in vitro* en la FL y en la FU de 12 variedades diferentes de trigo cultivadas en 4 zonas distintas, en 2 años de producción.

CA <i>in vitro</i>	Variedad y Zona			Variedad y Año		
	V	Z	V x Z	V	A	V x A
Fracción Libre						
TEAC	7,22 ***	7,46 ***	2,18 **	4,82 ***	0,18	0,69
FRAP	6,02 ***	5,17 ***	1,62 *	7,5 ***	0,38	4,43 ***
Fracción Unida						
TEAC	27,58 ***	0,8	9,36 ***	4,15 ***	5,66 *	3,6 ***
FRAP	4,39 ***	5,2 **	1,39	4,4 ***	3,04	3,54 ***

Resultados con * fueron significativos a $p < 0,05$; ** significativos a $p < 0,01$; *** significativos a $p < 0,001$.

Resultados sin * no fueron significativos.

La CA, determinada a través de TEAC y FRAP, demostró una fuerte influencia de la variedad en las dos fracciones analizadas (FL y FU), también la CA encontrada en la FL mostró una influencia significativa de la zona de cultivo en ambos métodos y lo mismo se observó para la FU cuando la CA se avaluó a través de FRAP. Por otro lado, la interacción entre la variedad y la zona de cultivo fue significativa en la CA encontrada en la FL a través de TEAC y FRAP, y en la CA de la FU cuando esta se determinó por TEAC.

Analizando los resultados obtenidos de CA (**Figuras 3.3 y 3.4**), y comparando los mismos entre distintas zonas de cultivo (**Anexo II, Tabla II.2**) se encontró que la zona SUB IV mostraba los valores significativamente ($p < 0,05$) más altos de CA (FT = FL + FU) cuando esta era evaluada a través de FRAP, pero mostraba los valores significativamente más bajos cuando se evaluaba a través de TEAC. Estas diferencias podrían estar condicionadas por los distintos compuestos polifenólicos presentes en los extractos de trigo, los cuales pueden tener distintos mecanismo de acción antioxidante.

El año de siembra sólo mostró una influencia significativa en la CA evaluada a través de TEAC en la FU de los extractos analizados, sin embargo se encontró una interacción significativa entre este y el genotipo (variedad) para la CA (TEAC y FRAP) encontrada en la FU y para la CA evaluada a través de FRAP en la FL de los extractos.

Lv *et al.* (2013), encontraron una fuerte influencia del ambiente (4 localidades de Maryland, Estados Unidos) y una interacción significativa entre el genotipo y el ambiente, sobre la CA encontrada en la FL de 10 variedades de trigo diferentes. Estos mismo resultados fueron encontrados por Moore *et al.* (2006), en la FL de 20 variedades cultivadas en 2 localidades diferentes de Colorado, Estados Unidos.

Estos resultados demuestran que la CA *in vitro* en extractos de trigo está influenciada por el genotipo y el ambiente en el cual estos se desarrollan. Sin embargo, el

genotipo es el que parece afectar mayormente a la CA evaluada a través de TEAC y FRAP, por lo que es necesario conocer cuáles son los compuestos presentes en las distintas variedades de trigos, responsables de esta capacidad, para favorecer su formación y obtener genotipos con mejores propiedades antioxidantes.

Debido a las diferencias encontradas en la CA *in vitro* (TEAC y FRAP), y a los tiempos necesarios para su desarrollo, la variedad ACA 315 y la variedad BIOINTA 3004 fueron elegidas para continuar con la determinación de la CA *in vivo*, y los estudios de correlación entre CA y perfil de compuestos polifenólicos.

3.3.1.2. *Ensayo de sobrevida de S. cerevisiae.*

La evaluación de la CA *in vivo* es necesaria debido a que el efecto real de un compuesto o extracto en un organismo puede estar afectado por problemas de permeabilidad, efectos secundarios de los productos generados a partir de las reacciones de estos con oxidantes, y también por el metabolismo que sufren dentro del mismo (Bednarska *et al.*, 2008).

En esta tesis la CA *in vivo* se evaluó a través del estudio de la capacidad que tienen los extractos de trigo, tanto la FL como la FU, para atenuar el estrés oxidativo provocado por un oxidante fuerte (H_2O_2) en cepas de *S. cerevisiae* mediante ensayos de sobrevida.

En primer lugar se evaluó la sobrevida de las levaduras frente a distintas concentraciones de extractos de trigo (FL y FU) de las dos variedades seleccionadas por poseer mayor y menor CA en los ensayos *in vitro* (ACA 315 y BIOINTA 3004, respectivamente). Este ensayo previo se realizó con el fin de encontrar la mínima concentración capaz de revertir el efecto producido por el H_2O_2 en las levaduras, sin producir toxicidad celular por sí mismo. La concentración de H_2O_2 utilizada (2,5 mM) fue determinada en ensayos previos. Esta concentración permitió un porcentaje (%) de sobrevida promedio de las levaduras del 44 % (**Figura 3.5** y **Figura 3.6**). Un porcentaje de sobrevida mayor resulta de difícil comparación con respecto a un control sin H_2O_2 , por otro lado, un porcentaje menor de sobrevida podría ser difícilmente recuperado por los extractos de trigo. Por otro lado las FLs y las FUs estudiadas en esta parte del ensayo se construyeron a partir de la mezcla de distintas FLs y FUs, correspondientes a las muestras extraídas por cada variedad de trigo; es decir, para la FL de BIOINTA 3004 se utilizaron 14 FLs provenientes de las 14 muestras extraídas de esta variedad, mientras que para la FL de ACA 315 se utilizaron 17 FLs, también una por cada muestra extraída. Lo mismo se hizo para las FUs.

En la **Figura 3.5** se muestran las distintas concentraciones ensayadas de las FLs procedentes de BIOINTA 3004 y ACA 315, frente a un control negativo de las levaduras sin exposición a H_2O_2 ni extracto (CN), y a un control positivo con H_2O_2 (CPo) sin extracto. El %

de sobrevida se calculó en relación a las levaduras control, y los resultados se expresaron como el porcentaje de unidades formadoras de colonias (UFC) por placa.

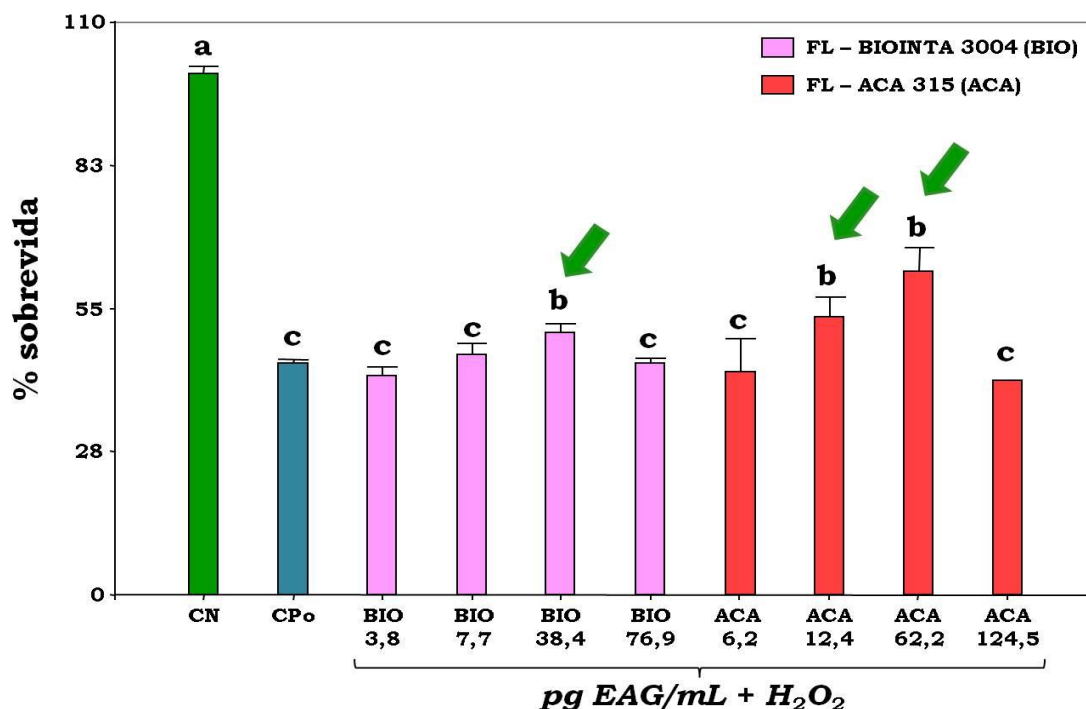


Figura 3.5. Porcentaje de sobrevida de las levaduras expuestas a distintas concentraciones de la FL de extractos de trigo de dos variedades (ACA 315 y BIOINTA 3004). CN es el control negativo (sin H₂O₂ y sin extracto); CPo es el control positivo (con H₂O₂ pero sin extracto agregado). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En cada FL se estudiaron 4 concentraciones diferentes de polifenoles. Para la FL de la variedad BIOINTA 3004 se encontró que la concentración de 38,4 pg EAG/mL presentaba la mayor tasa de sobrevida con respecto al CPo, mientras que para la variedad ACA 315 se encontró que las concentraciones 12,5 y 62,2 pg EAG/mL lograban recuperar a las levaduras luego del estrés oxidativo provocado por el H₂O₂. El resto de las concentraciones ensayadas no mostraron diferencias significativas en el % de sobrevida con respecto al CPo. Si bien estas concentraciones no resultaron citotóxicas para las levaduras, no lograron recuperarlas del estrés producido por el H₂O₂. Considerando todos estos resultados, y teniendo en cuenta las dos variedades estudiadas, se decidió continuar trabajando con una concentración final de polifenoles en la FL de 40 pg EAG/mL.

Este mismo ensayo se realizó para la FU de polifenoles en las dos variedades bajo estudio. En la **Figura 3.6** se muestran los resultados obtenidos de las distintas concentraciones estudiadas para la variedad BIOINTA 3004 y la variedad ACA 315.

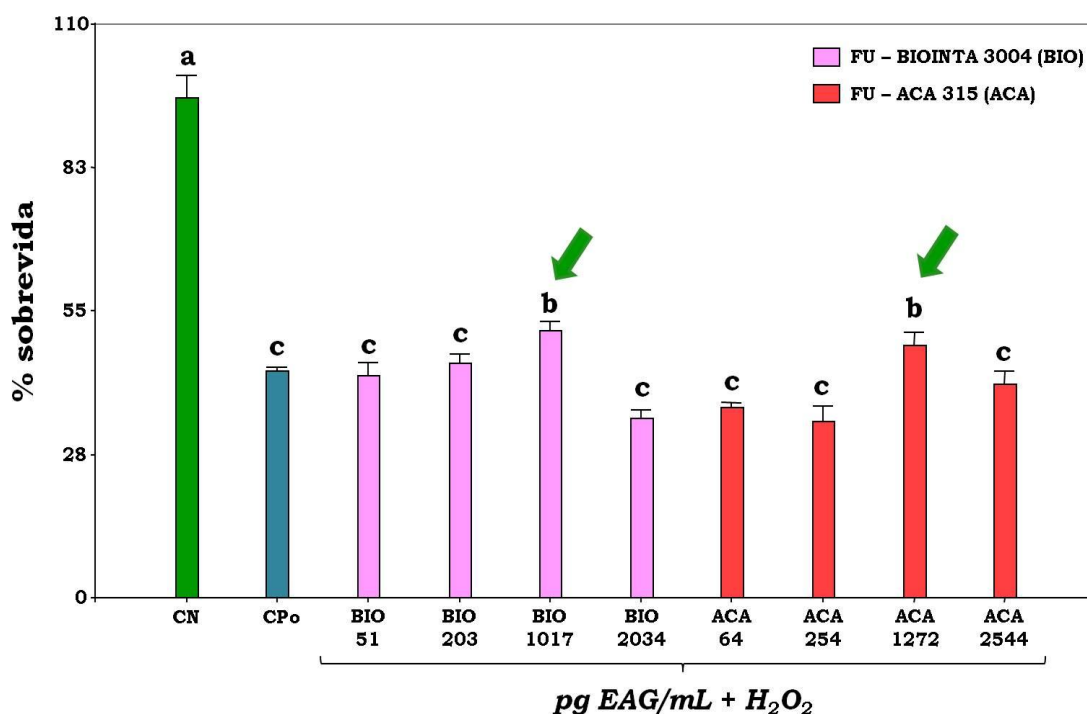


Figura 3.6. Porcentaje de sobrevida de las levaduras expuestas a distintas concentraciones de la FU de extractos de trigo de dos variedades (ACA 315 y BIOINTA 3004). CN es el control negativo; CPo es el control positivo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Al igual que para la FL, en la FU se estudiaron 4 concentraciones diferentes de polifenoles por cada variedad. Las concentraciones de 1.017 pg EAG/mL para la variedad BIOINTA 3004 y la concentración 1.272 pg EAG/mL para la variedad ACA 315, mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al CN, el resto de las concentraciones ensayadas no lograron diferenciarse estadísticamente del mismo. A partir de estos resultados se decidió seguir trabajando con una concentración final de polifenoles en la FU de 1.000 pg EAG/mL.

Luego de encontrar la mínima concentración de cada fracción capaz de revertir el efecto producido por el H_2O_2 en las levaduras, se procedió a realizar los ensayos de sobrevida con todas las muestras de cada variedad. Para tal fin se evaluaron 4 tratamientos por cada fracción:

- I- un control de las levaduras sin ningún tipo de exposición (CN);
- II- un control de levaduras expuesto a la FL (40 pg EAG/mL), o a la FU (1000 pg EAG/mL);
- III- un control de levaduras expuestas sólo a H_2O_2 (CPo);
- IV- exposición de las levaduras a las distintas FL, o FU, de cada variedad más el agregado del H_2O_2 .

En la **Figura 3.7** se muestran los resultados obtenidos para las FLs de las variedades estudiadas.

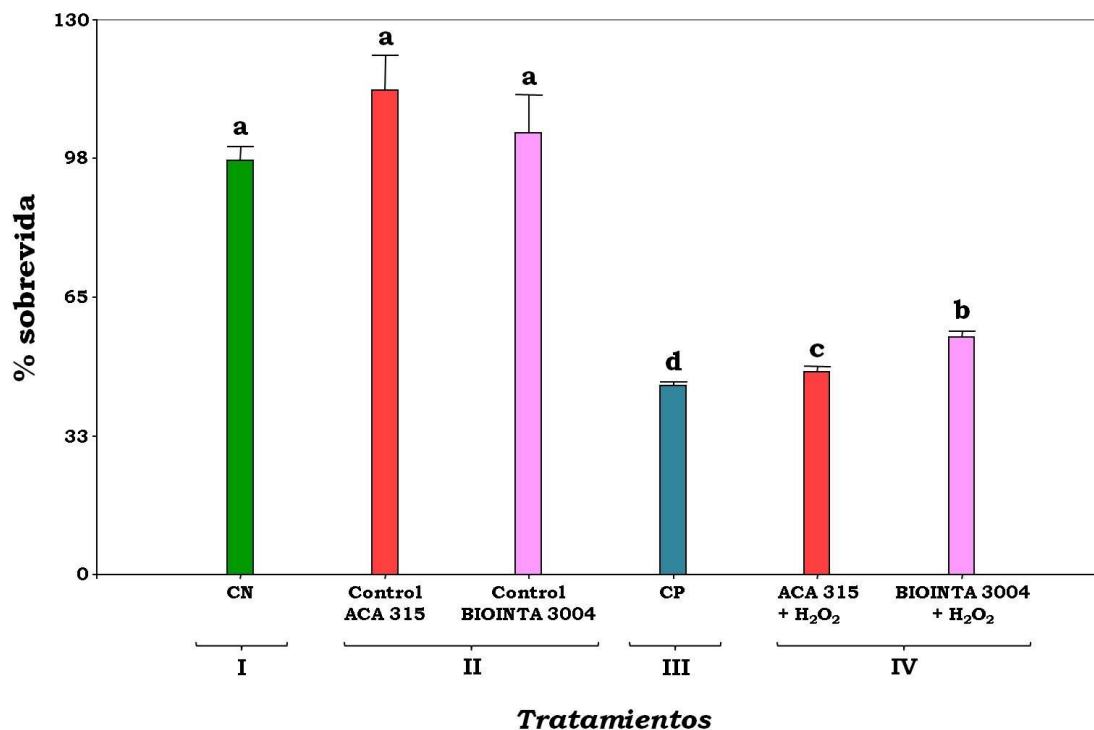


Figura 3.7. Porcentaje de sobrevivida de las levaduras (media \pm EE) expuestas a 40 pg/mL de FL de ACA 315 y BIOINTA 3004, con y sin H₂O₂. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Todas las muestras de la FL de cada una de las variedades de trigo evaluadas, fueron capaces de proteger a las levaduras del daño producido por el H₂O₂. La FL de la variedad BIOINTA 3004 aumentó un 11,3 % la tasa de sobrevivida con respecto al control de levaduras con H₂O₂ (CPo), mientras que la variedad ACA 315 mostró un aumento del 3,2 %. Con estos resultados se puede decir que la FL de extractos de trigo de la variedad BIOINTA 3004 posee mayor capacidad de atenuar el estrés oxidativo provocado por el H₂O₂ en cepas de *S. cerevisiae*. De la **Figura 3.7** también se desprende que los controles del tratamiento II no se diferenciaron significativamente del CN, por lo que no hay un efecto citotóxico de los extractos sobre las levaduras.

De la misma forma se evaluaron las FUs de los extractos de trigo de las dos variedades estudiadas. En la **Figura 3.8** se muestran los resultados obtenidos.

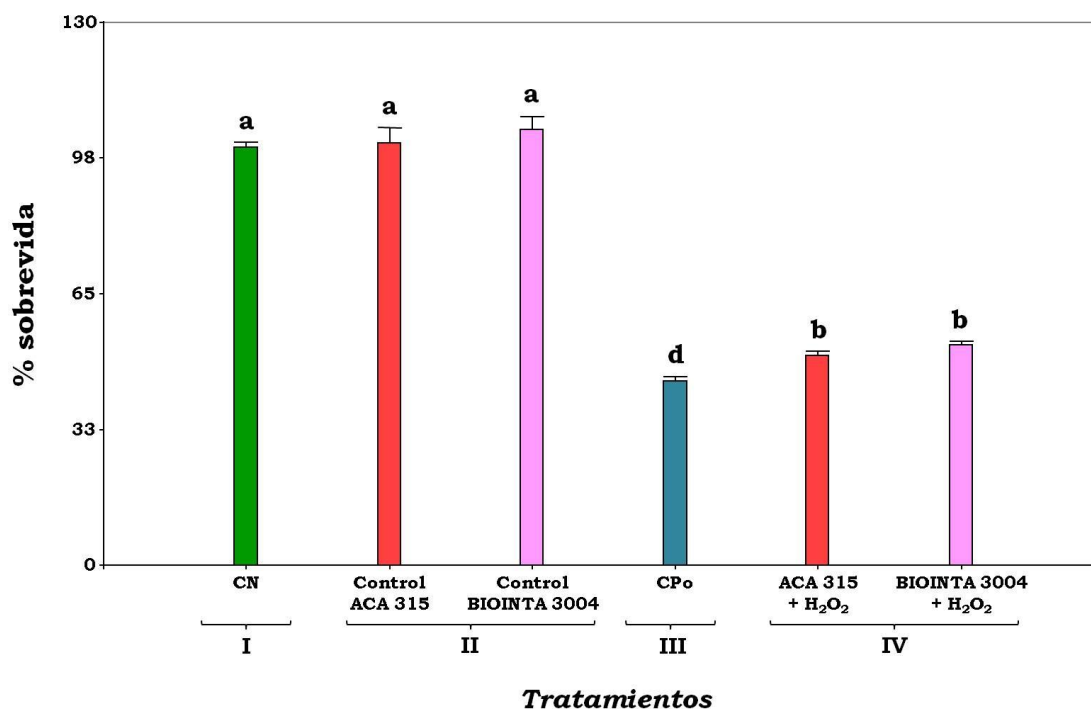


Figura 3.8. Porcentaje de sobrevida de las levaduras (media \pm EE) expuestas a 1000 pg/mL de FU de ACA 315 y BIOINTA 3004, con y sin H₂O₂. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Las muestras analizadas de la FU de cada una de las variedades de trigo estudiadas, fueron capaces de proteger a las levaduras del daño producido por el H₂O₂. La FU de la variedad BIOINTA 3004 aumentó un 8,8 % la tasa de sobrevida con respecto al CPo, mientras que la variedad ACA 315 mostró un aumento del 6,1 %, sin embargo, a diferencia de la CA encontrada en la FL, las tasas de sobrevida entre ambas variedades no pudieron ser diferenciadas estadísticamente. Por otro lado los controles del tratamiento II no se diferenciaron significativamente del CN, por lo que no se evidencia un efecto citotóxico sobre las levaduras.

Tanto la FL como la FU de los extractos de trigo de cada una de las dos variedades estudiadas lograron aumentar el % de sobrevida de *S. cerevisiae* frente a un estrés oxidativo, sin embargo, al contrario de lo encontrado en la evaluación de la CA *in vitro*, donde la variedad ACA 315 mostró los valores significativamente más altos de CA, fue la variedad BIOINTA 3004 la que presentó mayor CA *in vivo*. Adicionalmente a estos resultados, el estudio de la influencia de la zona y el año de cultivo, no parecen tener una influencia significativa sobre la CA evaluada *in vivo*. Tampoco se encontró una interacción significativa entre el genotipo y la zona, y entre el genotipo y el año de producción (**Tabla 3.2**).

Tabla 3.2. Estadístico F para un análisis combinado de la varianza para los valores obtenidos de CA *in vivo* en la FL y en la FU de 2 variedades diferentes de trigo cultivadas en 4 zonas distintas, en 2 años de producción.

CA <i>in vivo</i>	Variedad y Zona			Variedad y Año		
	V	Z	V x Z	V	A	V x A
FL	7,85 *	0,4	4,4 *	4,98 *	2,71	1,56
FU	0,86	0,75	0,38	2,17	8,76 **	3,61

Resultados con * fueron significativos a $p < 0,05$; ** significativos a $p < 0,01$. Resultados sin * no fueron significativos.

Hasta el momento no se encontraron trabajos donde utilicen *S. cerevisiae* para evaluar la CA de extractos de trigo. Sin embargo algunos trabajos han demostrado que este modelo puede servir para estudiar la CA en distintos alimentos. Mortorell *et al.* (2011), estudiaron la CA *in vivo* de cacao en polvo enriquecido con flavonoides. Ellos encontraron que éste era capaz de aumentar un 15,4 % la tasa de sobrevida de las levaduras con respecto a un CPo, siendo similar al porcentaje observado en células tratadas con vitamina C (19,3 %). Más tarde, Baroni *et al.* (2012), evaluaron CA de vinos argentinos encontrando un porcentaje de sobrevida entre 28 % y 12 % para los varietales cabernet sauvignon y syrah, respectivamente. Cheminet (2013) también encontró tasas de sobrevida entre 8 % y 30 % para extractos y decocciones de yerba mate. Estos resultados demuestran que los extractos de trigo analizados, presentan propiedades antioxidantes similares a las obtenidas en otros alimentos y bebidas de capacidad antioxidante reconocida.

Las diferencias encontradas entre la CA evaluada *in vitro* y la CA estudiada *in vivo*, pueden ser explicadas por el hecho de que los métodos *in vitro* ignoran la acción biológica que pueden tener los compuestos antioxidantes *in vivo*, como la actividad de las enzimas antioxidantes y/o la vía metabólica relacionada a la oxidación, activación/represión de genes que codifican las enzimas antioxidantes, o la activación de vías de señalamiento (Liu & Finley, 2005). Por lo que los efectos observados *in vitro* no necesariamente se correlacionan con los observados *in vivo*. Otro hecho importante que hay que tener en cuenta es que cuando se está en presencia de una mezcla de diferentes compuestos antioxidantes, como en el caso de los extractos de trigo, estos pueden mostrar reacciones aditivas, sinérgicas o antagónicas entre ellos, que resultan en diferentes acciones antioxidantes sobre distintos sistemas, por lo que no es extraño que los resultados obtenidos difieran entre los distintos métodos empleados.

3.3.2. Correlación entre CA *in vitro* e *in vivo* con el contenido de compuestos polifenólicos.

Para explicar las diferencias encontradas en la CA *in vitro* e *in vivo*, se estudió, a través de estadística multivariada, cómo el contenido y tipo de polifenoles influyen sobre la misma.

3.3.2.1. Influencia de los compuestos polifenólicos sobre CA *in vitro*.

Con el fin de evaluar si la CA *in vitro* encontrada en este trabajo es dependiente del contenido de polifenoles de los extractos de trigo, primero se analizó la correlación entre los valores de CA *in vitro* con el contenido de PT encontrado en cada fracción del extracto (**Tabla 3.3**).

Tabla 3.3. Coeficientes de correlación entre la CA *in vitro* (TEAC y FRAP) y el contenido de PT en FL, FU y FT (FL + FU).

	FRACCIÓN	TEAC	FRAP
PT	FL	0,53 ($p < 0,001$)	0,55 ($p < 0,001$)
	FU	0,61 ($p < 0,001$)	0,64 ($p < 0,001$)
	FT	0,58 ($p < 0,001$)	0,60 ($p < 0,001$)

Los valores de TEAC mostraron una relación positiva y significativa ($p < 0,001$) con el contenido PT tanto en la FL como en la FU de los extractos de trigo. Por otro lado los valores de FRAP también mostraron una relación estadísticamente significativa con el contenido de PT para las dos fracciones analizadas. Considerando las dos fracciones juntas (FT), se encontraron coeficientes de correlación R^2 de 0,58 con TEAC, y 0,60 con FRAP. Resultados similares fueron encontrados por Moore *et al.* (2006) en la FL de salvado de trigo. Ellos encontraron un coeficiente R^2 de 0,50 entre el contenido de PT y la CA evaluada a través de TEAC. Por otro lado Siebenhandl *et al.* (2007) encontraron una correlación significativa ($R^2 = 0,96$; $p < 0,05$) entre TEAC y el contenido de PT de la FT. Pérez-Jiménez & Saura-Calixto (2005) encontraron coeficientes R^2 de 0,79 para la FL y 0,89 para la FU (por hidrólisis enzimática), considerando el contenido de PT y FRAP en harina de trigo. Todos estos resultados demuestran que los compuestos polifenólicos contribuyen significativamente a la CA *in vitro* de los extractos de trigo.

Para confirmar esta hipótesis, y determinar si el perfil de compuestos polifenólicos determina la CA *in vitro*, se aplicó un análisis de correlación canónica entre la CA

(determinada por TEAC y FRAP) en las dos fracciones de extractos estudiadas (FL y FU), y todos los compuestos polifenólicos cuantificados en ellas. El análisis mostró una correlación significativa ($R^2 = 0,89$, $p < 0,001$) entre CA y el perfil polifenólico, por lo que el perfil de compuestos polifenólicos explicaría la CA *in vitro* encontrada en este trabajo. La contribución de los compuestos polifenólicos individuales a la CA se estudió a través de un análisis estadístico relativamente nuevo, *boosted regression trees* (BRT), que hasta el momento no ha sido aplicado al análisis de los alimentos. La única aplicación conocida de BRT hasta ahora es en el campo de la ecotoxicología (Hale *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2012). Este análisis permite modelar una variable regresora (CA) a través de 2 o más variables predictoras (polifenoles), identificando las variables más importantes para explicar la CA encontrada en los extractos de trigo estudiados.

En la **Tabla 3.4** se muestran los parámetros ajustados de cada modelo (para TEAC y FRAP) en las dos fracciones de extractos estudiadas. En esta misma tabla también se muestran las correlaciones de validación cruzada (VC) obtenidas para cada uno, la cual evalúa la calidad del modelo. Coeficientes cercanos a 1 en esta correlación, indican buenas predicciones del modelo.

Tabla 3.4. Parámetros ajustados para cada modelo de BRT y coeficientes de correlación de la validación cruzada (VC) obtenida.

CA <i>in vitro</i>	Parámetros del modelo			Correlación VC
	bag fraction	learning rate	tree complexity	
TEAC FL	0,65	0,010	2	0,996
TEAC FU	0,65	0,008	2	0,995
FRAP FL	0,70	0,008	2	0,999
FRAP FU	0,65	0,001	2	0,961

El estudio de la contribución de cada polifenol (variable predictora) al modelo (**Sección 3.2.6**) mostró que seis de los doce compuestos polifenólicos identificados y cuantificados en la FL de los extractos de trigo, correspondientes a las dos variedades de trigo (ACA 315 y BIOINTA 3004) (**Capítulo 2, Tabla 2.5**), lograron explicar 81,6 % de la variabilidad encontrada en la CA (evaluada a través de TEAC). En la **Figura 3.9** se muestran estas 6 variables y la contribución (entre paréntesis) de cada una de ellas al modelo obtenido, siendo el compuesto **5** (crisoeriol-6,8-di-C-pentósido) el que mostró mayor contribución al mismo (30,1 %). Estos gráficos muestran el efecto de cada compuesto sobre la CA (*fitted function*) después de considerar los efectos medios de las demás variables del

modelo. Sin bien estos gráficos no son una representación perfecta de los efectos de cada variable, proporcionan una base útil para la interpretación de los resultados obtenidos.

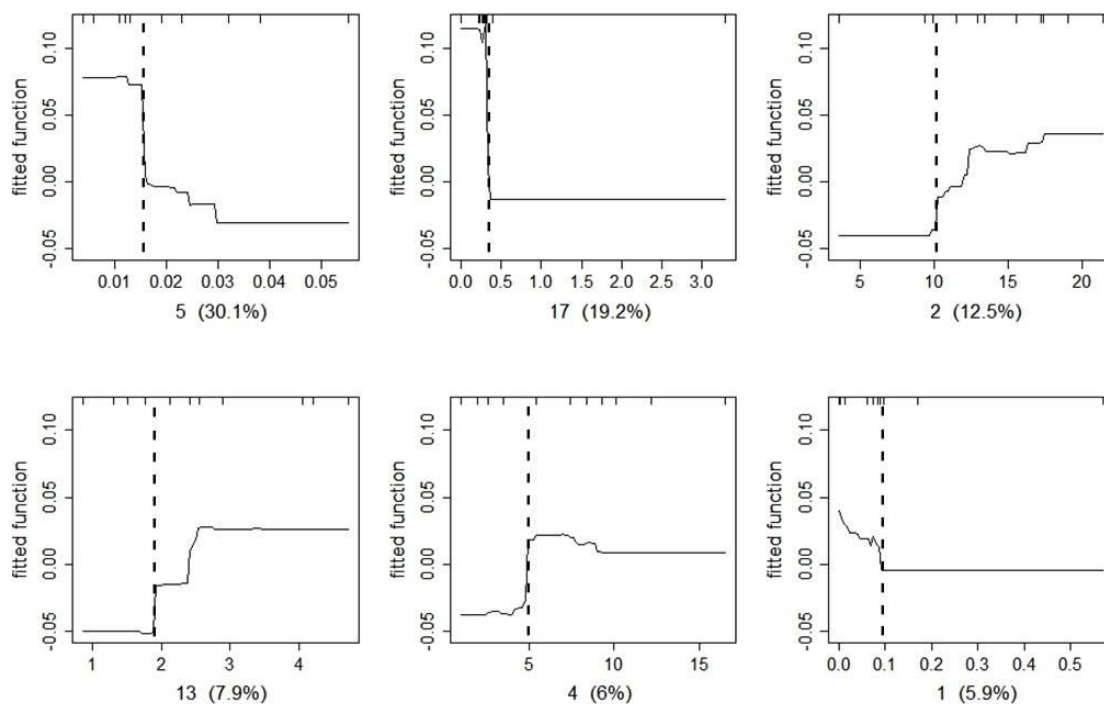


Figura 3.9. Variables predictoras y su contribución (entre paréntesis) al modelo ajustado para la CA evaluada a través de TEAC, en la FL de los extractos de trigo. El eje x muestra la concentración en mg/100g de cada compuesto, y el eje y es la función modelada de CA. Las líneas de punto indican cambios sobre la función de CA.

Tres (**5**, **17** y **1**) de los seis compuestos más importantes para explicar los resultados de CA (TEAC), mostraron que cuando estaban presentes a concentraciones bajas (menores a 0,015 mg/100g, 0,4 mg/100g y 0,09 mg/100g, respectivamente) permitían valores más altos de TEAC que cuando estaban presentes a concentraciones mayores a estos límites (**Figura 3.9**, líneas de punto), mientras que los tres compuestos restantes (**2**, **13** y **4**), cuando estaban en altas proporciones (mayores a 10 mg/100g, 1,9 mg/100g y 5 mg/100g, respectivamente), permitían valores mayores de TEAC. Si se comparan estos compuestos entre las dos variedades estudiadas (**Capítulo 2**, **Tabla 2.4**), se observa que la variedad BIOINTA 3004 presenta valores promedios más altos y superiores a los límites 0,015 mg/100g y 0,09 mg/100g de los compuestos **5** y **1** (ácido 2-hidroxi-3-O-β-D-glucopiranosilbenzoico), respectivamente; y valores más bajos e inferiores a 10 mg/100g y 1,9 mg/100g de los compuestos **2** (diglucósido de ácido hidroxibenzoico) y **13** (isómero 6 de ADF) respectivamente, con respecto a la variedad ACA 315, lo cual explicaría los valores más altos de TEAC encontrados en esta variedad (**Figura 3.3**).

Los compuestos **4** (triptófano) y **17** (ácido *trans*-ferúlico) no mostraron diferencias significativas entre estas dos variedades, pero mostraron contribuciones importantes (6 % y 19,2 %, respectivamente) a la CA evaluada a través de TEAC, por lo que, estos compuestos también son importantes para explicar la CA (TEAC) encontrada en la FL de los extractos de trigo.

Cuando se analizaron los resultados obtenidos para FRAP en la FL, se observó que 4 de los 12 compuestos cuantificados lograron explicar 82,6 % de la variabilidad encontrada en los datos (**Figura 3.10**), siendo el compuesto **11** (isómero 4 de ADF) el que más contribuyó a la CA evaluada a través de este método (30,6 %).

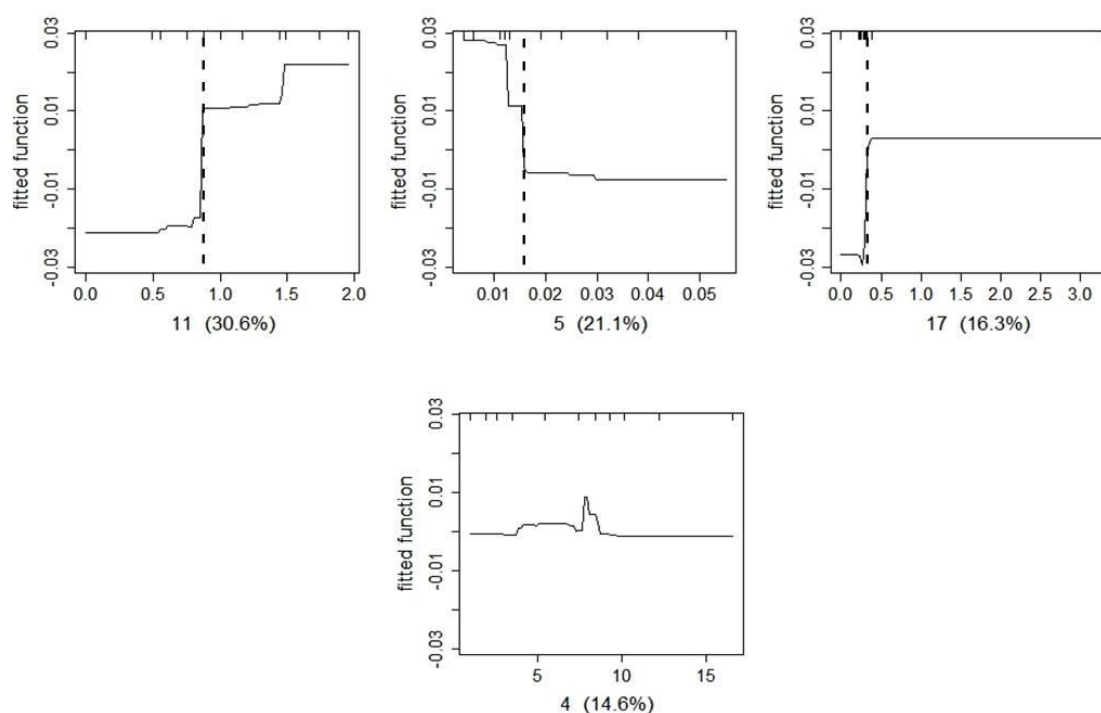


Figura 3.10. Variables predictorias y su contribución (entre paréntesis) al modelo ajustado para la CA evaluada a través de FRAP, en la FL de los extractos de trigo. El eje x muestra la concentración en mg/100g de cada compuesto, y el eje y es la función modelada de CA. Las líneas de punto indican cambios sobre la función de CA.

Los compuestos **11** y **17** mostraron valores altos de FRAP cuando estaban presentes a altas concentraciones (mayores a 0,9 mg/100g y 0,4 mg/100g, respectivamente), mientras que el compuesto **5** permitía valores altos de FRAP si estaba en concentraciones inferiores a 0,015 mg/100g; este último hecho también se observó en TEAC. Analizando los valores obtenidos de cada compuesto en las dos variedades estudiadas (**Capítulo 2, Tabla 2.4**), se observó que la variedad ACA 315 mostró un valor promedio más alto y superior a 0,9 mg/100g del compuesto **11** con respecto a la variedad BIOINTA 3004, mientras que ésta

última mostró un valor promedio superior a 0,015 mg/100g del compuesto **5**, concentración a la cual se producen valores bajos de FRAP. En cuanto a los compuesto **17** y **4**, no se observaron diferencias significativas entre los valores obtenidos en las dos variedades de trigo estudiadas, pero de algún modo, estos son importantes para los valores obtenidos de CA a través de FRAP.

Las diferencias encontradas entre los dos métodos (TEAC y FRAP) para evaluar la CA *in vitro* en la FL de los extractos de trigo, podrían ser explicadas por la naturaleza de los compuestos polifenólicos y por los diferentes mecanismo de acción que estos métodos evalúan, TEAC mide la capacidad de atrapamiento de radicales libres, mientras que FRAP mide el poder reductor de los compuestos antioxidantes presentes en los extractos de trigo.

Algunos autores encontraron correlaciones significativas entre TEAC y ácido ferúlico en distintos extractos de trigo (Anson *et al.*, 2008; Moore *et al.*, 2006; Siebenhandl *et al.*, 2007). Sin embargo, en estos trabajos no se estudia la influencia de todo el perfil de compuestos polifenólicos sobre la CA utilizando técnicas de estadística multivariada. Verma *et al.*, en el año 2009, estudiaron la contribución de los distintos compuestos polifenólicos identificados en extractos de trigo, sobre la CA evaluada a través de DPPH y TEAC, pero ellos calcularon esta contribución a partir de valores de CA obtenidos con estándares individuales de esos compuestos, lo que no reproduce las condiciones de un extracto que tiene una mezcla de compuestos en distintas proporciones.

Con respecto a la FU de los extractos de trigo analizados, 7 de los 14 compuestos identificados en esta fracción lograron explicar el 89,8 % de la variabilidad encontrada en TEAC entre las dos variedades de trigo estudiadas, siendo el compuesto **12** (isómero 5 de ADF) el más importante (29,7 %) para explicar esta variabilidad (**Figuras 3.11**).

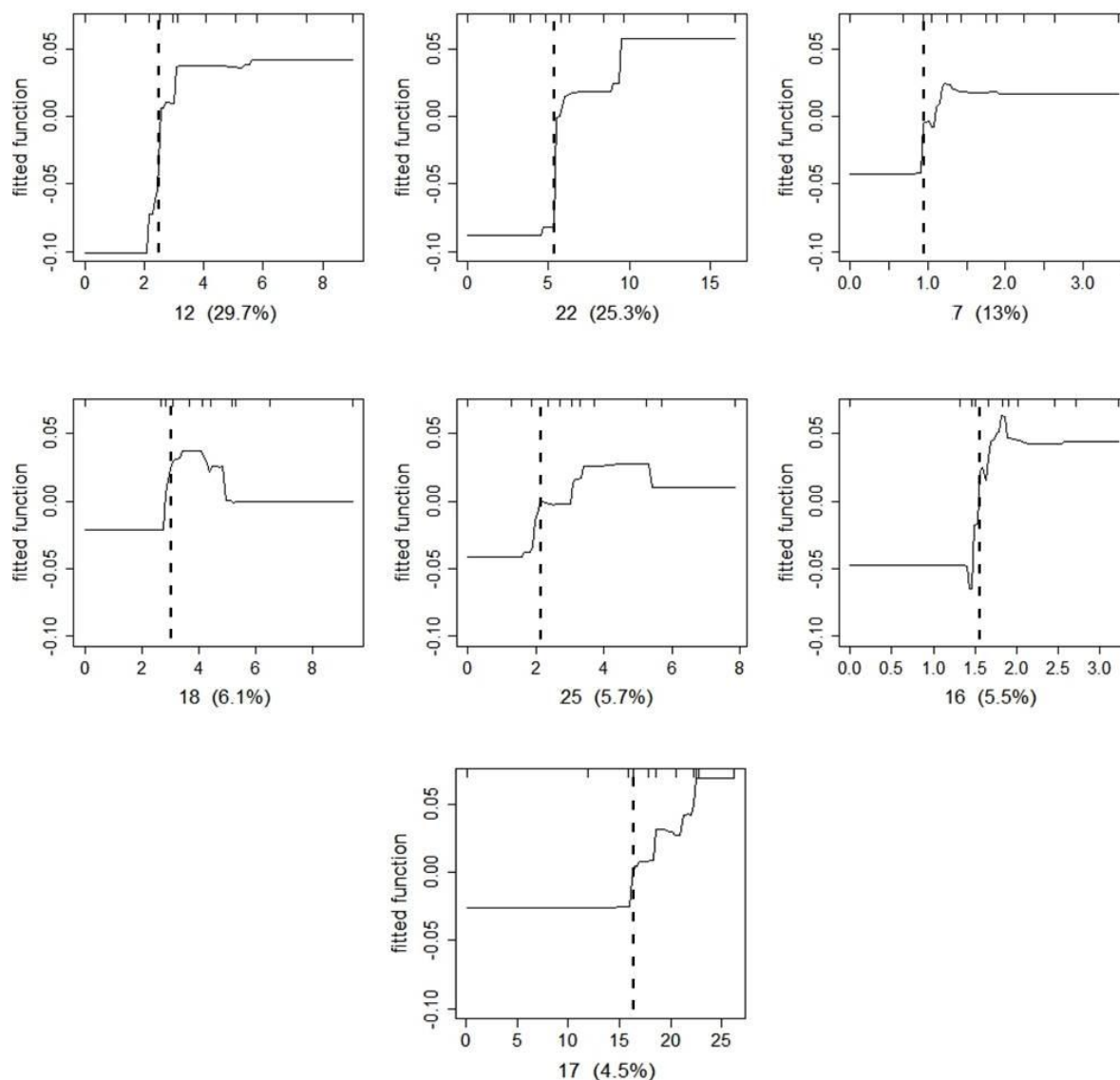


Figura 3.11. Variables predictoras y su contribución (entre paréntesis) al modelo ajustado para la CA evaluada a través de TEAC, en la FU de los extractos de trigo. El eje x muestra la concentración en mg/100g de cada compuesto, y el eje y es la función modelada de CA. Las líneas de punto indican cambios sobre la función de CA.

Los siete compuestos elegidos por el modelo mostraron que contribuían a valores mayores de CA cuando se encontraban en concentraciones superiores a 2,5 mg/100g, 5,5 mg/100g, 0,95 mg/100g, 3 mg/100g, 2,2 mg/100g, 1,55 mg/100g y 17 mg/100g (**12**, **22**, **7**, **18**, **25**, **16** y **17**, respectivamente). Seis de estos compuestos (**12**, **22**, **7**, **18**, **25** y **17**) mostraron diferencias significativas entre las dos variedades estudiadas, siendo los valores promedios de estos, superiores en la variedad ACA 315 (**Capítulo 2**, **Tabla 2.5**), lo que explicaría el valor más altos de CA encontrado en ella (**Figura 3.3**). En cuanto al compuesto

16 (derivado de ácido ferúlico), ACA 315 también presentó valores más altos de este, sin embargo no se observaron diferencias significativas con la variedad BIOINTA 3004.

El modelo generado para explicar la CA, determinada a partir de FRAP, en esta misma fracción (FU), mostró que 5 de los 14 compuestos cuantificados, podían explicar el 86,8 % de la variabilidad encontrada en los datos (**Figura 3.12**). Al igual que para la CA evaluada a través de TEAC, el compuesto **12** fue el que más contribuyó al modelo (32,7 %). Estos cinco compuestos mostraron que favorecían valores altos de FRAP cuando se encontraban en concentraciones superiores a 3,7 mg/100g, 4,5 mg/100g, 1,2 mg/100g, 21 mg/100g y 2,7 mg/100g (**12**, **22**, **7**, **20** y **23**, respectivamente), condiciones que se cumplen para la variedad ACA 315 (**Capítulo 2, Tabla 2.5**), la cual mostró valores superiores y estadísticamente significativos de estos compuestos con respecto a la variedad BIOINTA 3004.

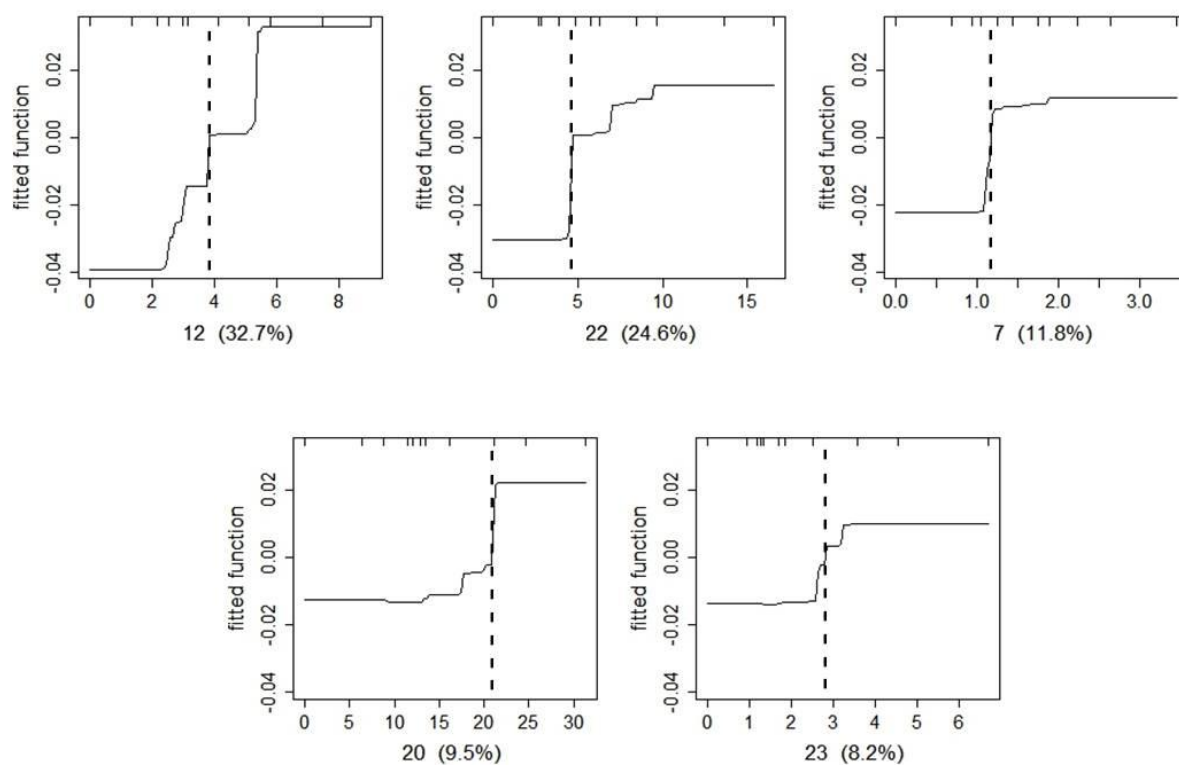


Figura 3.12. Variables predictoras y su contribución (entre paréntesis) al modelo ajustado para la CA evaluada a través de FRAP, en la FU de los extractos de trigo. El eje x muestra la concentración en mg/100g de cada compuesto, y el eje y es la función modelada de CA. Las líneas de punto indican cambios sobre la función de CA.

En esta fracción de compuestos polifenólicos, los compuestos **12** (isómero 5 de ADF), **22** (isómero 10 de ADF) y **7** (isómero 1 de ADF), fueron los que más contribuyeron a la CA evaluada a través de ambos métodos, mostrando que los valores de CA son altos cuando

estos compuestos están presentes a altas concentraciones. Adicionalmente, los tres mostraron casi la misma contribución en los dos modelos generados (TEAC y FRAP), independientemente de la acción antioxidante que se evalúa a través de cada uno, lo que los hace particularmente importantes, ya que podrían ejercer su acción antioxidante por dos vías: atrapando radicales libres y reduciendo compuestos oxidantes.

García-Conesa *et al.* (1999) midieron la capacidad antioxidante de distintos ácidos diferúlicos (ADFs) a través de TEAC y compararon estos resultados con los obtenidos para ácido ferúlico. Ellos encontraron que en general los ADFs mostraban mayor CA que el ácido ferúlico, siendo el 8,8'-ADF el más potente en fase acuosa.

En el capítulo anterior se observó que estos dímeros de ácido ferúlico (**Tabla 2.6**) eran importantes también para discriminar las distintas variedades de trigo estudiadas, lo que brinda evidencia adicional de que la CA está fuertemente influenciada por el tipo y contenido de compuestos polifenólicos.

3.3.2.2. Influencia de los compuestos polifenólicos sobre CA *in vivo*.

Con respecto a la CA evaluada *in vivo*, también se estudió la correlación con el contenido de polifenoles totales y con el perfil de polifenoles en los extractos (FL y FU). En la FL de los extractos de trigo se encontró que la CA *in vivo* mostraba una relación estadísticamente significativa ($p < 0,001$) y negativa con el contenido de PT, presentando un coeficiente R^2 de -0,62. Por otro lado, en la FU no se encontró una correlación significativa entre ambos. Resultados similares fueron reportado por García Ferreira (2011) en muestras de vinos argentinos.

Este hecho, puede ser debido a que la acción antioxidante de los polifenoles dentro de un organismo vivo no sólo depende de la estructura química de estos, sino que también estará condicionada por las interacciones aditivas, antagónicas y sinérgicas entre los distintos compuestos presentes, por su biodisponibilidad, y por el metabolismo que sufran antes de ejercer su efecto. Es por esto que no es fácil extrapolar metodologías de seguimiento (*screening*) *in vitro* con metodologías *in vivo*. Debido a esto, se decidió estudiar la correlación entre la CA *in vivo* con el perfil de compuestos polifenólicos identificados y cuantificados en los extractos de trigo analizados. Para ello se aplicó un análisis de correlación canónica (ACC), entre los resultados de sobrevida obtenidos en FL y FU, versus todos los compuestos polifenólicos cuantificados en ambas fracciones. ACC mostró una correlación significativa ($R^2 = 0,96$; $p < 0,001$) entre los porcentajes de sobrevida y el perfil polifenólico. Este resultado indica que el perfil de compuestos polifenólicos también influye sobre la CA *in vivo* encontrada. Para determinar cómo cada compuesto polifenólico individual interviene sobre la CA *in vivo* se utilizó nuevamente el análisis BRT.

En la **Tabla 3.5** se muestran los parámetros ajustados del modelo para las dos fracciones de extractos estudiadas. En esta misma tabla también se muestran las correlaciones de validación cruzada (VC) obtenidas para cada uno.

Tabla 3.5. Parámetros ajustados para cada modelo de BRT y coeficientes de correlación de la validación cruzada (VC) obtenida.

CA <i>in vivo</i>	Parámetros del modelo			Correlación VC
	bag fraction	learning rate	tree complexity	
FL	0,65	0,01	2	1,000
FU	0,60	0,01	2	0,949

Seis de los doce compuestos polifenólicos cuantificados en la FL de los extractos de trigo lograron explicar 71 % de la variabilidad encontrada en la determinación de la CA *in vivo* (Figura 3.13). El compuesto **5** (crisoeriol-6,8-di-C-pentósido) fue el que más contribuyó a esta (20,3 %), seguido por el compuesto **2** (15,3 %, diglucósido de ácido hidroxibenzoico) y el compuesto **17** (13,7 %, ácido *trans*-ferúlico). De estos seis compuestos, sólo los compuestos **5** y **6** mostraron que, cuando estaban presentes a concentraciones mayores de 0,011 mg/100g y 0,3 mg/100g, respectivamente, permitían valores altos de CA *in vivo* (Figura 3.13). El resto de los compuestos permitieron valores altos de CA *in vivo*, cuando sus concentraciones estuvieron por debajo de 15 mg/100g, 0,25 mg/100g, 0,08 mg/100g y 0,7 mg/100g (**2**, **17**, **1** y **11**, respectivamente). Analizando los resultados de cada compuesto obtenidos para cada variedad de trigo estudiada (Capítulo 2, Tabla 2.4), se observa que estas condiciones se cumplen para la variedad BIOINTA 3004, lo cual explicaría la mayor CA *in vivo* encontrada para la misma.

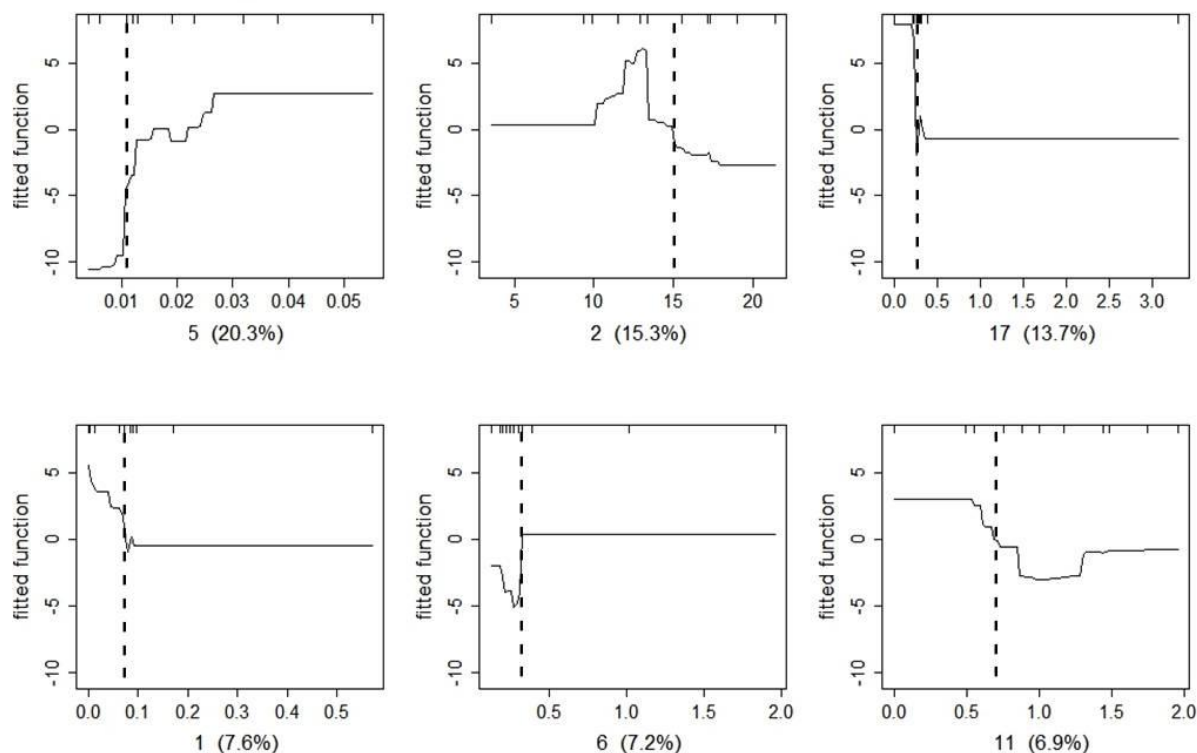


Figura 3.13. Variables predictoras y su contribución (entre paréntesis) al modelo ajustado para la CA *in vivo*, en la FL de los extractos de trigo. El eje x muestra la concentración en mg/100g de cada compuesto, y el eje y es la función modelada de CA. Las líneas de punto indican cambios sobre la función de CA.

Teniendo en cuenta estos resultados de CA *in vivo* en la FL de los extractos y comparando con los obtenidos para la CA *in vitro* (**Figura 3.9 y 3.10**), se puede concluir que los compuestos **5**, **17**, **11**, **2** y **1**, serían los más importantes para explicar los valores de TEAC, FRAP y % de sobrevida encontrados, ya que estos compuestos presentaron las contribuciones más altas para explicar la CA *in vitro* e *in vivo* encontradas en la FL de polifenoles presentes en trigo.

En cuanto a la FU de los extractos de trigo analizados, 7 de los 14 compuestos identificados en esta fracción lograron explicar 70,3 % de la variabilidad encontrada en la CA *in vivo*, entre las dos variedades de trigo estudiadas, siendo el compuesto **16** (derivado de ácido ferúlico) el más importante (23,2 %) para explicar esta variabilidad (**Figuras 3.14**). El resto de los compuestos presentaron contribuciones entre 9,4 % y 6,4 %. Los compuestos **16**, **20** y **18** favorecen valores altos de CA *in vivo* cuando están presentes en concentraciones superiores a 1,4 mg/100g, 21 mg/100g y 3 mg/100g, mientras que el compuesto **12** favorece valores altos de CA cuando está presente en concentraciones inferiores a 4,4 mg/100g.

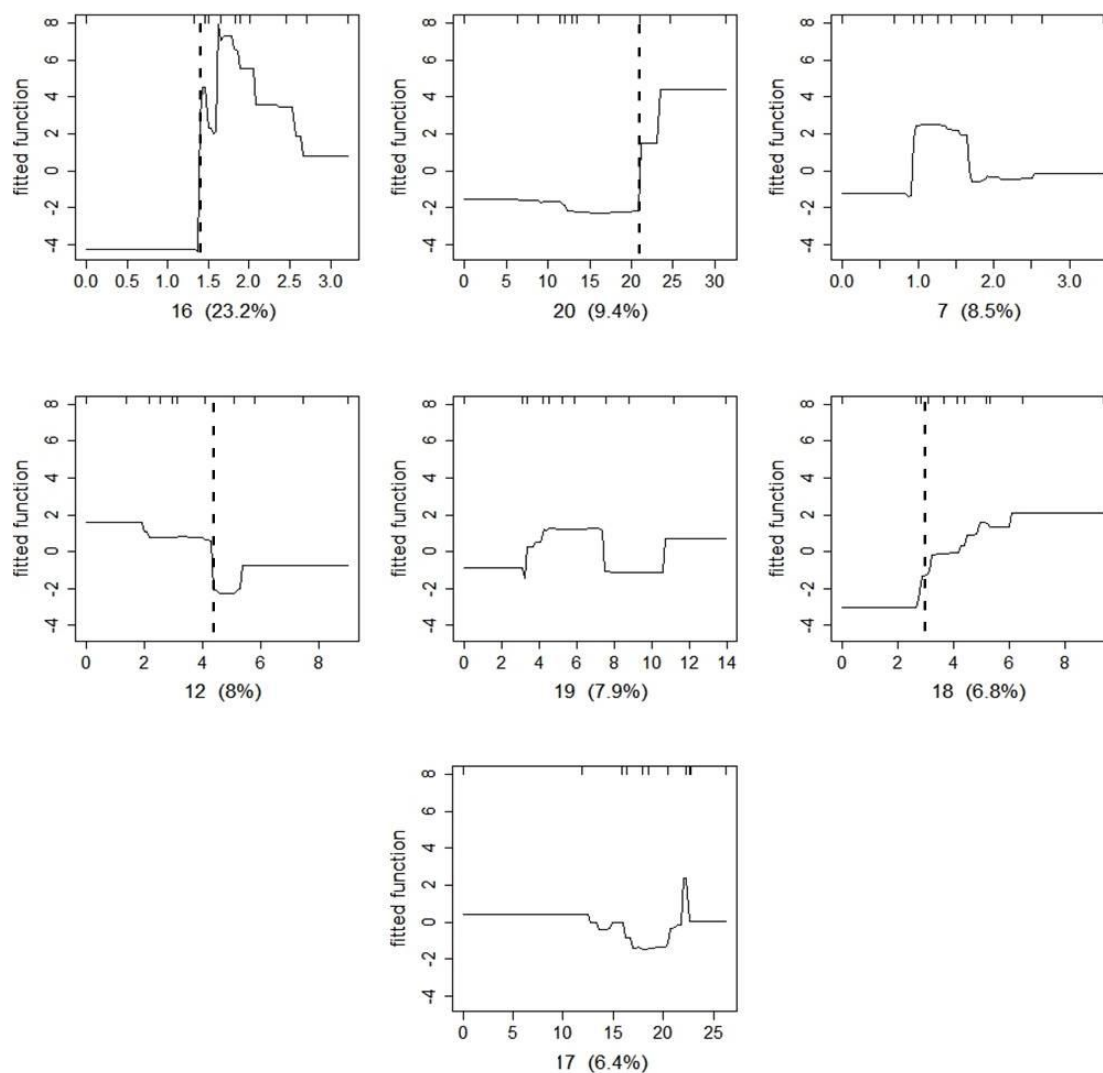


Figura 3.14. Variables predictoras y su contribución (entre paréntesis) al modelo ajustado para la CA *in vivo*, en la FU de los extractos de trigo. El eje x muestra la concentración en mg/100g de cada compuesto, y el eje y es la función modelada de CA. Las líneas de punto indican cambios sobre la función de CA.

Si bien la variedad ACA 315 presentó valores significativamente mayores de estos compuestos con respecto a la variedad BIOINTA 3004 (**Capítulo 2, Tabla 2.5**), estas diferencias no fueron importantes para resultar en valores significativamente distintos de CA *in vivo* (**Figuras 3.8**), lo que se desprende al analizar los límites a los cuales los compuestos logran diferenciar entre distintos valores de CA *in vivo*. Las dos variedades presentaron concentraciones superiores a 1,4 mg/100g y 3 mg/100g de los compuestos **16** y **18**, respectivamente, y valores inferiores a 21 mg/100g del compuesto **20**; mientras que ACA 315 mostró valores superiores a 4,4 mg/100g del compuesto **12** y en BIOINTA 3004 este compuesto estuvo por debajo del límite de cuantificación.

Teniendo en cuenta estos resultados de CA *in vivo* en la FU de los extractos y comparando con los obtenidos para CA *in vitro* determinada a través de TEAC y FRAP (**Figura 3.9** y **3.10**), se puede concluir que los compuestos **12**, **22**, **7**, **20**, **18**, **16** y **17** serían los más importantes para explicar los valores de TEAC, FRAP y % de sobrevida encontrados, ya que estos compuestos presentaron las contribuciones más altas para explicar la CA *in vitro* e *in vivo* encontradas en la FU de polifenoles presentes en trigo.

Las diferencias encontradas entre la CA evaluada *in vitro* y la CA estudiada *in vivo*, pueden ser explicadas analizando el contenido y tipo de compuestos polifenólicos presentes en las distintas fracciones de los extractos de trigo analizados. Estos compuestos, demostraron distintas contribuciones en cada uno de los métodos empleados para determinar la CA (TEAC, FRAP y % de sobrevida) lo que indica que, más allá de la acción antioxidante que pueda tener un compuestos polifenólico por sí solo, ésta estará condicionada por la interacción entre los distintos compuestos, por el medio de reacción, por la biodisponibilidad de cada uno y por el metabolismo que estos puedan sufrir dentro de un organismo vivo. Por lo que estudiar el comportamiento antioxidante de un extracto a través de más de una metodología, logra un mejor conocimiento sobre la acción de los compuestos antioxidantes presentes en él.

3.4. CONCLUSIONES.

En este capítulo se estudió la capacidad antioxidante en 146 muestras de trigo correspondientes a 12 genotipos diferentes, procedentes de 4 zonas delimitadas por el INTA a lo largo de 2 años de producción.

En primer lugar se estudió la CA a través de dos métodos químicos, TEAC y FRAP, comúnmente utilizados en la literatura para este fin. Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas entre las distintas variedades de trigo analizadas. La variedad ACA 315 presentó los valores más altos en ambos métodos, mientras que las variedades BIOINTA 3004 y KLEIN CAPRICORNIO mostraron los valores más bajos. Adicionalmente se encontró que la zona y año de cultivo influenciaban la CA de los distintos extractos estudiados.

Por otro lado, la CA también se estudió sobre la levadura *S. cerevisiae*, para una evaluación de la potencialidad del extracto como agente antioxidante en organismos vivos. En esta etapa dos variedades de trigo (ACA 315 y BIOINTA 3004), procedentes de 4 zonas y 2 años de producción, fueron seleccionadas a partir de los resultados obtenidos en el análisis de CA *in vitro* y el perfil de compuestos polifenólicos. Los resultados obtenidos mostraron que los extractos de trigo eran capaces de aumentar el % de sobrevida de *S. cerevisiae* frente a un estrés oxidativo inducido por H₂O₂, siendo la variedad BIOINTA 3004 la que presentó mayor CA *in vivo*. Adicionalmente, el estudio de las variaciones en la CA debidas a la zona y año de cultivo, no mostraron una influencia significativa sobre la CA evaluada *in vivo*.

Finalmente, a través del análisis de correlación canónica (ACC) y de boosted regression trees (BRT), se logró estudiar la influencia del perfil de compuestos polifenólicos sobre la CA evaluada a través de TEAC, FRAP y % de sobrevida. Los resultados obtenidos mostraron que el perfil de polifenoles condiciona la CA encontrada en los extractos de trigo analizados. Se encontró que los compuestos más importantes para explicar los resultados obtenidos en la FL de los extractos fueron los compuestos: ác. 2-hidroxi-3-O-β-D-glucopiranosilbenzoico, diglucósido de ácido hidroxibenzoico, crisoeriol-6,8-di-C-pentósido, isómero 4 de ácido diferúlico (ADF) y ácido *trans*-ferúlico (**1**, **2**, **5**, **11** y **17**, respectivamente), ya que presentaron las contribuciones más altas para explicar la CA *in vitro* e *in vivo* encontradas en esta fracción de polifenoles. Por otro lado, los compuestos: derivado de ácido ferúlico, ácido *trans*-ferúlico, ácido *cis*-ferúlico, y los isómeros 1, 5, 9 y 10 de ADF (**16**, **17**, **18**, **7**, **12**, **20** y **22**) serían los más importantes para explicar los resultados obtenidos en la FU para las dos variedades de trigo estudiadas.



CAPÍTULO 4

FIDEOS INTEGRALES: CAMBIOS EN LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DURANTE SU ELABORACIÓN Y DIGESTIÓN GASTRO-INTESTINAL IN VITRO.

4.1. INTRODUCCIÓN.

En las últimas décadas ha crecido el interés por elaborar alimentos de calidad y valor nutricional para conseguir los máximos beneficios de la dieta. En este contexto, empezaron a tener relevancia la naturaleza de los ingredientes con los cuales un alimento se elabora, los efectos de la fórmula y las distintas etapas de elaboración, como así también el efecto de la cocción sobre los nutrientes de los mismos. Uno de los alimentos elaborados a partir de harina de trigo que está siendo objeto de estudio es la pasta o fideo. Este alimento, ampliamente distribuido y consumido en el mundo, ha cobrado importancia debido a que puede elaborarse a partir de diferentes cereales, con distinto valor nutricional, o bien puede ser fortificado con diferentes nutrientes, supliendo distintas necesidades poblacionales (Chillo *et al.*, 2008; Knuckles *et al.*, 1997).

Dentro de los compuestos que han empezado a evaluarse durante la elaboración de fideos, destacan los polifenoles, ya que han demostrado efectos beneficiosos sobre la salud humana por su acción antioxidante. Se sabe que los antioxidantes naturales contenidos en los alimentos se pierden significativamente durante la producción del mismo (Baiano *et al.*, 2009; Hirawan *et al.*, 2010; Verardo *et al.*, 2011). Así, por ejemplo, durante la elaboración de pastas la presencia de oxígeno, agua y calor inducen la degradación oxidativa de los antioxidantes (Fares *et al.*, 2008). Sin embargo, también se ha demostrado que después de aplicar tratamientos térmicos a un alimento, la capacidad antioxidante del mismo se incrementa (Fares *et al.*, 2010; Zielinski *et al.*, 2001), lo que podría deberse a la formación de nuevos compuestos con propiedades antioxidantes, como lo son los productos de la reacción de Maillard (Hirawan *et al.*, 2010), o bien, en el caso de las pastas, el agua hirviendo podría estar favoreciendo una mayor disponibilidad de los compuestos antioxidantes presentes en el trigo (Fares *et al.*, 2010).

En esta parte de la tesis se busca conocer el cambio en el perfil de polifenoles que se da en el proceso de cocción de fideos integrales secos. Particularmente, se espera conocer cuáles son los compuestos antioxidantes que se degradan y cuáles aumentan en el proceso de cocción de fideos integrales. La evaluación del cambio en el perfil de polifenoles, sumado a la medición del poder antioxidante por técnicas como TEAC o FRAP permitiría entender las razones para un cambio en las propiedades antioxidante de estos productos como consecuencia de la cocción.

Para avanzar sobre el conocimiento de cómo los antioxidantes presentes en un alimento procesado pueden ejercer su efecto sobre el organismo humano, también se busca estudiar la estabilidad y biodisponibilidad de los compuestos antioxidantes encontrados en fideos integrales cocidos, durante la digestión gastro-intestinal humana y su posterior absorción a través del intestino delgado. Para que un compuesto polifenólico sea capaz de tener un efecto potencialmente beneficioso sobre la salud, debe ser capaz de resistir las condiciones encontradas a través del tracto gastro-intestinal y además tiene que ser capaz de atravesar la membrana intestinal (Manach *et al.*, 2005).

En este contexto, la **biodisponibilidad** se define como la proporción de nutrientes de un alimento que se digiere, absorbe y metaboliza para estar disponible en su sitio de acción (Srinivasan, 2001). Este concepto es muy importante, ya que los polifenoles más abundantes no siempre son los más activos en el organismo, ya sea porque tienen una menor actividad intrínseca, su absorción en el intestino es baja, son altamente metabolizados o se excretan rápidamente (Manach *et al.*, 2004; Srinivasan, 2001). Algunos polifenoles, son relativamente poco absorbidos en el intestino (su absorción varía entre 0,3 % a 43 %), por lo que la concentración de sus metabolitos en plasma puede ser muy baja (Manach *et al.*, 2005). El resto de los polifenoles pueden llegar al colon, principalmente aquellos que forman ésteres, glicósidos o polímeros, donde son fermentados por la microflora colónica, dando lugar a metabolitos que son absorbidos y aparecen como derivados conjugados en el plasma, a través del cual se distribuyen a órganos y tejidos (Clifford, 2004). Una vez absorbidos y metabolizados, estos compuestos pueden volver al duodeno a través de la circulación enterohepática, prolongando su presencia en el organismo o bien, pueden ser eliminados por orina (Manach *et al.*, 2004). En la **Figura 4.1** se muestra un esquema simplificado de la absorción y transformación de los compuestos polifenólicos.

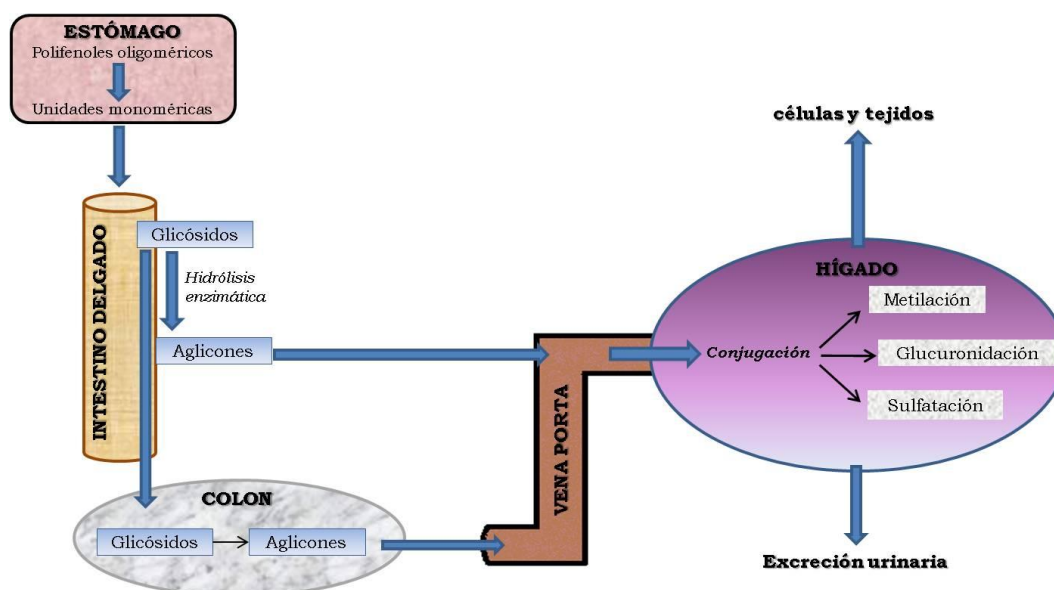


Figura 4.1. Esquema ilustrativo de la absorción y transformación de polifenoles presentes en alimentos. Adaptado de D'Archivio *et al.* (2010).

Muchos factores pueden influenciar la biodisponibilidad de un compuesto, entre ellos destacan: su bioaccesibilidad, su absorción, su distribución en los tejidos y su bioactividad (Mateo Anson *et al.*, 2009). El primer paso para entender la biodisponibilidad es estudiar la bioaccesibilidad. La **bioaccesibilidad** es la fracción de un compuesto que se

libera de la matriz del alimento en el lumen gastrointestinal, y de ese modo queda disponible para ser absorbido en el intestino (Saura-Calixto *et al.*, 2007). Esta **absorción** puede estar influenciada por la solubilidad del compuesto, la interacción con otros ingredientes de los alimentos, transformaciones moleculares, diferentes transportes celulares, metabolismo y la interacción con la microbiota intestinal (Neilson & Ferruzzi, 2011). Sólo aquellos polifenoles liberados de la matriz del alimento por la acción de enzimas digestivas y la microflora bacteriana (intestino grueso) están bioaccesibles en el intestino y por lo tanto potencialmente biodisponibles para ejercer su efecto (bioactividad) sobre el organismo humano.

En esta parte de la tesis se busca estudiar la bioaccesibilidad de los compuestos polifenólicos encontrados en fideos integrales cocidos a través de un modelo experimental que simula la digestión gastro-intestinal humana y posterior absorción. Este modelo de simulación está siendo ampliamente utilizado por ser rápido, seguro y no tener restricciones éticas como los sistemas *in vivo*. Además, permite acoplar el análisis químico de los alimentos y la fisiología humana permitiendo predecir el comportamiento *in vivo* de sus componentes.

Hasta el momento son pocos los trabajos que estudiaron la bioaccesibilidad de compuestos antioxidantes en productos elaborados a partir de harina de trigo (Gawlik-Dziki *et al.*, 2009; Mateo Anson *et al.*, 2010). Algunos autores encontraron que en general la digestión aumenta la capacidad antioxidante de cereales con respecto a extractos de estos (Liyana-Pathirana & Shahidi, 2005; Nagah & Seal, 2005; Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2005), probablemente debido a las condiciones ácidas encontradas en el estómago o a la hidrólisis enzimática en el duodeno (Pérez-Jiménez y Saura-Calixto, 2005). Por lo tanto, la digestión parece ser un factor importante en la potenciación de la capacidad antioxidante de cereales (Baublis *et al.*, 2000). Estos resultados son particularmente importantes ya que sugieren que los antioxidantes ejercen su efecto en el tracto digestivo, proporcionando un entorno que protege el epitelio intestinal de compuestos pro-oxidantes.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.2.1. Estándares y reactivos.

Para la digestión gastro-intestinal *in vitro* de fideos integrales se utilizaron las enzimas: α -amilasa humana Tipo IX-A, pepsina P-7000 de mucosa estomacal de cerdo, pancreatina P-1750 de páncreas de cerdo y extracto de bilis B-8631 de cerdo obtenidas de Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina).

El agua utilizada para las determinaciones y la cocción de fideos fue ultra pura (menos de 5 $\mu\text{g/L}$ de TOC) obtenida de un sistema de purificación Arium 61316-RO acoplado a un sistema Arium 611-UV (Sartorius, Alemania).

4.2.2. Muestras.

Para este trabajo se utilizaron mezclas (“pools”) de muestras provenientes de dos variedades de trigo, ACA 315 y BIOINTA 3004.

4.2.3. Elaboración de fideos integrales.

La elaboración de fideos integrales se realizó utilizando la metodología descrita por Bustos *et al.* (2011), la cual se dividió en 4 etapas:

Amasado: se mezclaron 50 g de harina integral con 19 mL de agua ultra pura, conteniendo NaCl al 1 % p/v. La cantidad necesaria de agua para la formación de la masa se determinó en ensayos previos con distintos volúmenes de agua hasta obtener una masa con las características apropiadas para el posterior laminado. La mezcla se amasó a velocidad máxima por 3 minutos, utilizando una batidora eléctrica doméstica, luego se formó un bollo uniforme con las manos y se dejó reposar por 10 minutos cubierto con un film de nylon. Transcurrido este tiempo, se estiró el bollo formando un cuadrado uniforme para facilitar el posterior laminado.

Laminado: la masa obtenida se pasó por una laminadora Pastalinda modelo Extra en su máxima apertura de rodillos (1), se realizó un pliegue y se pasó nuevamente por la laminadora con el pliegue en forma perpendicular a los rodillos. Se repitió la operación 7 veces. Posteriormente, se pasó la masa por los siguientes 7 niveles inferiores de apertura hasta el número 8, realizando el mismo procedimiento. Por último, se pasó una vez más por los rodillos en el punto de mínima apertura (8), sin hacer ningún pliegue, obteniendo una

lámina de masa de unos 0,90 mm de espesor. Para realizar el corte de los fideos se pasó la lámina de pasta por los rodillos cortantes en la posición 3, obteniendo piezas de 2 mm de ancho.

Secado: Las piezas cortadas se colgaron en un soporte de madera, evitando la superposición, para favorecer el secado parejo de las mismas. Luego se colocó el soporte de madera con la pasta en una estufa a 30°C, sin control de humedad relativa, durante 30 minutos y, posteriormente, se llevó a una estufa a 45°C y 75 % de humedad relativa, con el objeto de obtener una pasta con un contenido de humedad inferior al 12%. Finalmente, la pasta se cortó en piezas de 5 cm de largo y se envasaron en bolsas plásticas selladas hasta el momento de la cocción. La pasta obtenida hasta este momento se denominará fideo integral seco.

Cocción: se colocaron 8 gramos de fideo integral seco en 400 mL de agua ultra pura hirviendo durante 8 min. El tiempo óptimo de cocción (8 min) se determinó previamente retirando la pasta a distintos tiempos de cocción. El tiempo óptimo es aquel donde al comprimir la pasta entre dos placas de vidrio no se observa una línea blanca, correspondiente al almidón sin gelatinizar (**Figura 4.2**).

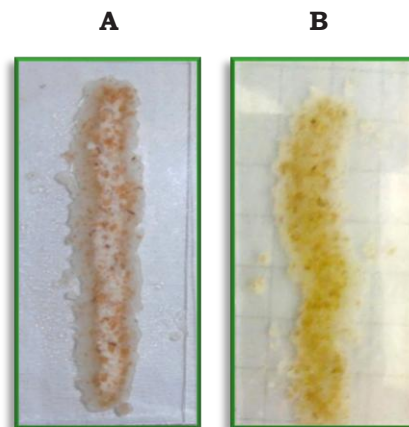


Figura 4.2. Tiempo óptimo de cocción de fideos integrales. **A:** 5 minutos de cocción; **B:** 8 minutos de cocción, tiempo óptimo para conseguir una pasta al dente.

La harina integral, los fideos integrales secos y los fideos integrales cocidos se liofilizaron en un Liofilizador L-T8 RIFICOR, y se conservaron a -80°C hasta su análisis.

4.2.4. Extracción de polifenoles.

La extracción de compuestos polifenólicos se realizó de acuerdo al protocolo descrito en el **Capítulo 2, Sección 2.2.3.**

4.2.5. Bioaccesibilidad de polifenoles presentes en fideos integrales cocidos.

La evaluación de la bioaccesibilidad de los compuestos polifenólicos encontrados en fideos integrales cocidos, se realizó a través de la utilización de un modelo de simulación de digestión gastro-intestinal *in vitro*.

La metodología empleada para simular la digestión *in vitro* se basó en los trabajos publicados por Hu *et al.* (2013), Hiller *et al.* (2011) y Ramírez-Moreno *et al.* (2011) con algunas modificaciones. El procedimiento se realizó en 3 etapas: la primera para imitar el proceso de digestión en la boca, la segunda para simular el proceso de digestión en el estómago (digestión gástrica), y la última para simular la digestión y la absorción de los compuestos fenólicos en el intestino delgado (digestión en el duodeno). Todas las muestras fueron procesadas por triplicado, y se realizaron distintos muestreos a lo largo del procedimiento.

Digestión bucal: saliva humana: La etapa de digestión bucal se realizó utilizando un pool de saliva humana ($n = 2$), recolectada exactamente como describe Hu *et al.* (2013). Dos gramos de fideos integrales recién cocidos se colocaron en un tubo plástico Falcon de 15 mL, al cual se agregaron 2 mL de saliva humana recién recolectada. Para simular la etapa de masticación, se homogenizó la mezcla en un homogeneizador de tejidos ultra-turrax T18 (Ika-Labortechnik, Alemania) a 22.000 rpm por 30 s; finalmente se agregaron 2 mL de agua ultra pura lavando el vástago del homogeneizador. Inmediatamente se ajustó el pH a 2 con 30 μ L de HCl 6 M para detener la acción de la enzima α -amilasa, acondicionando el medio para continuar con la digestión gástrica.

Digestión gástrica: Al homogenato obtenido a partir de la digestión bucal se le agregaron 500 μ L (12.640 unidades) de una solución de pepsina (20 mg de pepsina en 500 μ L de HCl 0,1 M), y se lo incubó con agitación por 2 h a 37°C para simular la etapa de digestión gástrica.

Digestión y absorción intestinal: Después de la incubación con la enzima gástrica pepsina, se agregaron al homogenato obtenido 3 mL de una solución de pancreatina/bilis de cerdo (15 mg de pancreatina de cerdo más 75 mg de extracto de bilis porcina en 3 mL de NaHCO₃ 0,1 M, pH = 7,5). La mezcla obtenida se colocó en una bolsa de diálisis SnakeSkin® de 10 KDa, la cual permite simular parcialmente la absorción de los compuestos fenólicos a través

de la membrana del intestino delgado. La bolsa de diálisis perfectamente cerrada se colocó dentro de un frasco de vidrio de 100 mL, conteniendo 25 mL de una solución de NaHCO_3 0,1 M a $\text{pH} = 7,5$. La bolsa completamente sumergida se dejó dializar por 3 h a 37°C .

Por cada muestra de fideo integral cocido digerido, se obtuvieron 4 submuestras recolectadas a lo largo del procedimiento anteriormente descrito: la primera se obtuvo al finalizar la etapa de digestión bucal (submuestra BOC); la segunda al concluir la digestión gástrica (submuestra GAS); y las otras 2 muestras al finalizar la etapa de digestión intestinal (submuestras INT y ABS). La submuestra INT representa al homogenato presente en el interior de la membrana de diálisis, y la submuestra ABS, solución obtenida después de la diálisis en el frasco de vidrio, representa a los compuestos polifenólicos que estarían biodisponibles.

Las submuestras BOC, GAS e INT recolectadas se centrifugaron a 13.000 g durante 15 min, y las submuestras INT y ABS se acidificaron con ácido fórmico hasta $\text{pH} = 2$. Inmediatamente, todas las submuestras se filtraron por filtros de $0,45\ \mu\text{m}$ de poro, se fraccionaron y se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

4.2.6. Determinación de compuestos polifenólicos.

4.2.6.1. Contenido de polifenoles totales (PT).

Para la determinación de PT en la elaboración de fideos se procedió de la misma forma que en el **Capítulo 2, Sección 2.2.4.1**. Para la determinación a lo largo del tracto digestivo se utilizaron $10\ \mu\text{L}$ de las submuestras BOC y ABS, y $50\ \mu\text{L}$ de las submuestras GAS e INT.

4.2.6.2. Determinación del perfil de polifenoles por HPLC-DAD-ESI-QTOF.

Para la determinación del perfil de polifenoles en la elaboración de fideos se procedió de la misma forma que en el **Capítulo 2, Sección 2.2.4.2**. Para la determinación del perfil de polifenoles a lo largo del tracto digestivo hubo algunas modificaciones con respecto al anterior: la separación cromatográfica se realizó en una columna Kromasil 100-5 (Kromasil®, Bhaus, Suecia) de fase reversa C18 ($5\ \mu\text{m}$, $250\ \text{mm} \times 4,60\ \text{mm}$ de diámetro interno); y el estándar apigenina se reemplazó por genisteína.

4.2.7. Determinación de la capacidad antioxidante *in vitro*.

La capacidad antioxidante (CA) *in vitro* se midió a través de los métodos TEAC y FRAP descritos en el **Capítulo 3, Sección 2.2.4**. Para la determinación de la CA a lo largo de la elaboración de fideos se procedió de la misma forma que para los extractos de trigo entero. Para la determinación de la CA a lo largo del tracto digestivo el reactivo de trabajo se preparó en buffer PBS (pH = 7,5). La medición se realizó de la forma anteriormente mencionada (**Capítulo 3, Sección 2.2.4**).

4.2.8. Tratamiento estadístico de los datos.

El programa utilizado para la interpretación de los resultados generados en esta parte de la tesis fue el paquete **InfoStat** (Di Rienzo *et al.*, 2008).

Se utilizó el análisis de la varianza para comparar los resultados entre las distintas etapas de elaboración de fideos y entre las distintas etapas de la digestión gastro-intestinal *in vitro*, utilizando el mismo procedimiento que se describió en el **Capítulo 1, Sección 1.2.6**.

4.3. DESCRIPCIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

4.3.1. Elaboración de fideos integrales.

El grano de trigo sufre transformaciones físicas y químicas a lo largo de la elaboración de un alimento, lo que puede producir alteraciones en sus propiedades antioxidantes. En esta parte de la tesis se busca evaluar los cambios en el perfil de compuestos fenólicos, y sus propiedades antioxidantes, a lo largo del proceso de elaboración de fideos integrales.

En las **Tablas 4.1** y **4.2** se muestra el contenido de polifenoles totales (PT) y de los distintos compuestos polifenólicos cuantificados, en la fracción libre (FL) y en la fracción unida (FU) de extractos de harina integral, fideos integrales secos crudos y fideos integrales secos cocidos, de las dos variedades estudiadas, ACA 315 y BIOINTA 3004, respectivamente.

Tabla 4.1 Contenido de PT (mg EAG/100g) y compuestos polifenólicos (mg/100g) en distintas etapas de la elaboración de fideos integrales secos cocidos a partir de la variedad ACA 315.

Compuesto	Harina integral		Fideos Crudos		Fideos cocidos	
	FL	FU	FL	FU	FL	FU
1 ác. 2-hidroxi-3-O-β-D-glucopiranosilbenzoico	0,03375 ± 0,00011 a	-	0,0134 ± 0,0025 b *	-	< LD	-
2 diglucósido de ácido hidroxibenzoico	8,26 ± 0,09 a *	-	2,7 ± 0,3 c	-	5,590 ± 0,004 b *	-
3 glucósido de ácido hidroxibenzoico	18,3 ± 0,9 b	-	14,3 ± 0,8 c	-	23,9722 ± 0,0008 a	-
4 triptófano	10,66 ± 0,12 a *	-	0,01749 ± 0,00003 c	-	3,8 ± 0,6 b	-
5 crisoeriol-6,8-di-C-pentósido	0,006593 ± 0,000019 a	-	0,003079 ± 0,00008 b	-	0,0024 ± 0,0003 b	-
6 8-C-glucosil-6-C-arabinosil-apigenina	0,1895 ± 0,0018 a	-	0,145 ± 0,017 b	-	0,13012 ± 0,00003 b	-
7 ác. diferúlico (isómero 1)	-	0,7 ± 0,3 B	-	0,78 ± 0,18 B	-	1,8848 ± 0,0022 A *
8 6-C-glucosil-8-C-arabinosil-apigenina	0,151 ± 0,004 a	-	0,114 ± 0,012 b	-	0,0977 ± 0,0013 b	-
9 ác. diferúlico (isómero 2)	-	1,3 ± 0,9 B	-	1,672 ± 0,006 B	-	3,30 ± 0,21 A
10 ác. diferúlico (isómero 3)	0,84076 ± 0,00014 a *	-	0,7642 ± 0,0004 b *	-	0,657 ± 0,012 c *	-
11 ác. diferúlico (isómero 4)	1,13 ± 0,04 a *	-	0,90 ± 0,07 b *	-	0,726 ± 0,004 b *	-
12 ác. diferúlico (isómero 5)	-	1,4 ± 0,3 B	-	1,433 ± 0,013 B	-	2,99 ± 0,18 A
13 ác. diferúlico (isómero 6)	2,16 ± 0,04 a *	-	1,6 ± 0,10 b *	-	1,09 ± 0,13 c *	-
14 ác. diferúlico (isómero 7)	-	2,7 ± 0,8 B	-	2,714 ± 0,025 B *	-	6,4 ± 0,3 A
15 ác. cumárico	-	0,991 ± 0,025 B	-	0,9497 ± 0,0008 B *	-	1,080 ± 0,008 A *
16 derivado de ác. ferúlico	< LD	2,72 ± 0,26 A *	0,524 ± 0,012 *	1,6 ± 1,0 B *	0,507 ± 0,004 *	1,52 ± 0,08 B *
17 ác. <i>trans</i> -ferúlico	0,6158 ± 0,0014 b	11,8 ± 0,8 B	1,02 ± 0,08 a *	13 ± 3 A *	0,72 ± 0,05 b	11,7 ± 0,3 B *
18 ác. <i>cis</i> -ferúlico	0,528 ± 0,004 a *	4,4 ± 1,1 B	0,520 ± 0,007 b *	4,5 ± 1,1 B *	0,525 ± 0,005 a	4,75 ± 0,14 A *
19 ác. diferúlico (isómero 8)	-	4,3 ± 1,5 A *	-	2,38 ± 0,03 B	-	4,268 ± 0,016 A
20 ác. diferúlico (isómero 9)	-	10,2 ± 2,2 A *	-	6,300 ± 0,017 B	-	10,9 ± 0,4 A
21 <i>p</i> -coumaroil-feruloilputrescina	0,5078 ± 0,0011	-	< LD	-	< LD	-
22 ác. diferúlico (isómero 10)	-	4,7 ± 1,5 A *	-	3,00 ± 0,05 B	-	5,92 ± 0,18 A
23 ác. triferúlico	-	1,23 ± 0,21 B	-	0,75 ± 0,25 B	-	1,98 ± 0,08 A
24 ác. diferúlico (isómero 11)	-	6,4 ± 1,8 A *	-	3,91 ± 0,15 B *	-	7,56 ± 0,20 A
25 ác. diferúlico (isómero 12)	-	1,3 ± 0,4 B	-	1,2 ± 0,5 B	-	3,00 ± 0,06 A
Suma polifenoles individuales	43,4 ± 0,9 a	54 ± 3 B *	22,7 ± 0,4 c	43,8 ± 2,1 C *	37,8 ± 0,7 b	67,3 ± 1,2 A
PT	37,7 ± 1,8 a *	42 ± 5 B *	34,0 ± 1,6 a	32,97 ± 0,11 B *	30,1 ± 1,2 b *	61,5 ± 0,6 A

<LD significa menor al límite de detección. LD metodológico (mg/100g): 1 (0,0013), 16 (0,5) y 21 (0,5). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en la misma fila: a > b > c para la fracción libre (FL); A, B y C para la fracción unida (FU). Muestras marcadas con * son significativamente mayores a las mismas muestras de la variedad BJOINTA 3004.

Tabla 4.2 Contenido de PT (mg EAG/100g) y compuestos polifenólicos (mg/100g) en distintas etapas de la elaboración de fideos integrales secos cocidos a partir de la variedad BIOINTA 3004.

Compuesto	Harina integral		Fideos Crudos		Fideos cocidos	
	FL	FU	FL	FU	FL	FU
1 ác. 2-hidroxi-3-O-β-D-glucopiranosilbenzoico	0,08319 ± 0,00022 a *	-	0,0125 ± 0,0016 b	-	< LD	-
2 diglucósido de ácido hidroxibenzoico	8,2 ± 0,6 a	-	2,76 ± 0,06 b *	-	4,9 ± 0,9 b	-
3 glucósido de ácido hidroxibenzoico	24,2 ± 1,0 a *	-	19,2 ± 1,3 b *	-	27 ± 5 a *	-
4 triptófano	10,1 ± 0,4 a	-	0,024 ± 0,004 b *	-	8,4 ± 0,6 a *	-
5 crisoeriol-6,8-di-C-pentósido	0,0323 ± 0,0023 a *	-	0,0160 ± 0,0010 b *	-	0,0116 ± 0,0013 b *	-
6 8-C-glucosil-6-C-arabinosil-apigenina	0,38 ± 0,03 a *	-	0,28 ± 0,04 b *	-	0,262 ± 0,005 b *	-
7 ác. diferúlico (isómero 1)	-	1,12 ± 0,08 B *	-	0,95 ± 0,07 B *	-	1,756 ± 0,020 A
8 6-C-glucosil-8-C-arabinosil-apigenina	0,339 ± 0,017 a *	-	0,22 ± 0,03 b *	-	0,219 ± 0,007 b *	-
9 ác. diferúlico (isómero 2)	-	1,99 ± 0,11 B *	-	1,7 ± 0,4 B *	-	4,1 ± 0,3 A *
10 ác. diferúlico (isómero 3)	0,5952 ± 0,0011 a	-	0,577 ± 0,014 a	-	0,549 ± 0,007 b	-
11 ác. diferúlico (isómero 4)	0,774 ± 0,022 a	-	0,716 ± 0,009 b	-	0,701 ± 0,021 b	-
12 ác. diferúlico (isómero 5)	-	1,93 ± 0,11 B *	-	1,62 ± 0,13 B *	-	3,66 ± 0,10 A *
13 ác. diferúlico (isómero 6)	1,64 ± 0,05 a	-	1,24 ± 0,05 b	-	1,018 ± 0,016 c	-
14 ác. diferúlico (isómero 7)	-	3,2 ± 0,3 B *	-	2,53 ± 0,05 B	-	6,8 ± 0,3 A *
15 ác. cumárico	-	1,0468 ± 0,0012 A *	-	0,9243 ± 0,0006 C	-	1,011 ± 0,013 B
16 derivado de ác. ferúlico	< LD	2,16 ± 0,06 A	0,513 ± 0,010	1,54 ± 0,14 B	0,505 ± 0,007	1,29 ± 0,10 B
17 ác. <i>trans</i> -ferúlico	0,647 ± 0,005 b *	11,6 ± 1,9 A	0,89 ± 0,06 a	8,50 ± 0,15 B	0,770 ± 0,008 a *	11,4 ± 0,6 A
18 ác. <i>cis</i> -ferúlico	0,512 ± 0,010 b	4,5 ± 0,7 A	0,515 ± 0,007 b	3,0 ± 0,4 B	0,5250 ± 0,0016 a	4,414 ± 0,015 A
19 ác. diferúlico (isómero 8)	-	4,0 ± 0,4 B	-	3,3 ± 0,8 B *	-	5,93 ± 0,16 A *
20 ác. diferúlico (isómero 9)	-	8,5 ± 2,3 B	-	6,6 ± 0,9 B *	-	13,9 ± 1,8 A *
21 <i>p</i> -coumaroil-feruloilputrescina	0,594 ± 0,012 a *	-	0,566 ± 0,024 b	-	0,5719 ± 0,0016 b	-
22 ác. diferúlico (isómero 10)	-	4,4 ± 0,4 B	-	3,01 ± 0,13 B *	-	8,5 ± 0,5 A *
23 ác. triferúlico	-	1,29 ± 0,10 B *	-	1,15 ± 0,17 B *	-	2,3 ± 0,3 A *
24 ác. diferúlico (isómero 11)	-	5,6 ± 0,7 B	-	3,86 ± 0,20 B	-	9,0 ± 0,6 A *
25 ác. diferúlico (isómero 12)	-	2,173 ± 0,008 B *	-	1,28 ± 0,17 C *	-	3,12 ± 0,17 A *
Suma polifenoles individuales	48,07 ± 0,16 a *	53 ± 7 B	27,6 ± 1,4 b *	39,9 ± 1,0 B	45,2 ± 7 a *	77 ± 3 A *
PT	37,4 ± 0,6 a	42,10 ± 0,07 B	37 ± 8 a *	32,4 ± 1,6 C	28,2 ± 1,0 b	69,6 ± 1,6 A *

<LD significa menor al límite de detección. LD metodológico (mg/100g): 1 (0,0013), 16 (0,5) y 21 (0,5). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en la misma fila: a > b > c para la fracción libre (FL); A, B y C para la fracción unida (FU). Muestras marcadas con * son significativamente mayores a las mismas muestras de la variedad ACA 315.

Los resultados en ambas variedades de trigo estudiadas mostraron una disminución significativa para la mayoría de los compuestos polifenólicos en la FL de fideos crudos, con respecto a las muestras de harina. La suma de los compuestos individuales encontrados en la FL de fideos crudos, comparada con la suma de aquellos presentes en la FL de muestras de harina, mostró una disminución (-48 %) en la variedad ACA 315 y una disminución (-43 %) en la variedad BIOINTA 3004, siendo los compuestos **2** (diglucósido de ácido hidroxibenzoico), **3** (glucósido de ácido hidroxibenzoico) y **4** (triptófano) los principales responsables de la misma. Sin embargo, el contenido de PT no disminuyó significativamente entre fideos crudos y harinas en ninguna de las dos variedades estudiadas. Este mismo resultado se observó para el compuesto **18** (ácido *cis*-ferúlico), mientras que la cantidad del compuesto **17** (ácido *trans*-ferúlico) fue significativamente mayor en fideos crudos con respecto a harinas para ambas variedades de trigo.

La cocción de fideos integrales, también provocó una disminución significativa del contenido de PT en la FL. En esta fracción también se observó un descenso en la concentración de los compuestos **1** (ácido 2-hidroxi-3-O- β -D-glucopiranosilbenzoico), **10** (isómero 3 de ácido diferúlico) y **11** (isómero 4 de ácido diferúlico) con respecto a fideos crudos y harinas; mientras que los derivados de ácido hidroxibenzoico (compuestos **5**, **6** y **8**), y los compuestos **13** (isómero 6 de ácido diferúlico) y **21** (*p*-coumaroil-feruloilputrescina), mostraron una disminución significativa con respecto a la harina pero no con respecto a los fideos crudos. Sin embargo, al analizar la suma de los compuestos individuales en los fideos cocidos, se encontró que la disminución de los compuestos polifenólicos fue menos pronunciada que la encontrada en fideos crudos, ya que la variedad ACA 315 mostró una disminución del 13 % con respecto a harinas, mientras que la variedad BIOINTA 3004 sólo mostró una disminución del 6 % con la harina correspondiente. Los compuestos responsables de esta disminución fueron: diglucósido de ácido hidroxibenzoico (**2**), glucósido de ácido hidroxibenzoico (**3**) y triptófano (**4**). A pesar de sufrir una disminución de estos compuestos (**2**, **3** y **4**) desde la harina a los fideos crudos, la cocción produce un aumento significativo de los mismos.

Por otro lado, al analizar la FU de los extractos de harina y fideos crudos en las dos variedades de trigo, se observa una disminución aproximada del 22 % en la suma del contenido individual de polifenoles y PT en fideos crudos con respecto a harinas, siendo los principales responsables de esta disminución los isómeros 8, 9, 10 y 11 de ácidos diferúlicos (compuestos **19**, **20**, **22** y **24**), sumados al compuesto **16** (derivado de ácido ferúlico). En cuanto a la FU de fideos cocidos, sucede lo contrario. El contenido de PT en FU de fideos cocidos se incrementa un 46 % en la variedad ACA 315, y en un 65 % en la variedad BIOINTA 3004, con respecto a las harinas correspondientes; mientras que la suma de los polifenoles individuales para la misma fracción (FU-cocidos) mostraron un aumento del 24 % para ACA 315 y del 44 % para BIOINTA 3004 con relación a las harinas de partida.

En líneas generales, se puede decir que la elaboración de fideos integrales secos crudos produce una disminución significativa de los compuestos polifenólicos presentes en

la harina de partida, tanto en la FL como en la FU, siendo la FL la más afectada por esta disminución. Estos resultados están de acuerdo a los reportados en la bibliografía consultada. Fares *et al.* (2010), informaron una disminución significativa de compuestos polifenólicos en la FL de fideos crudos elaborados a partir de harina de trigo enriquecida con distintas fracciones de salvado. Verardo *et al.* (2011), también encontraron una disminución del 45,9 % en la suma de compuestos polifenólicos en la FL de fideos crudo elaborados con harina de trigo entero. Esta disminución puede tener lugar debido a que, durante la elaboración de la pasta (etapas de amasado, laminado y secado), estos compuestos pueden sufrir una degradación oxidativa causada por la presencia de agua, presencia de O₂, sumado al calor generado por la fricción en el amasado y la estufa de secado (Fares *et al.*, 2008).

Por otro lado, la cocción de los fideos integrales (secos crudos) provocó una disminución significativa de polifenoles presentes en la FL con respecto a muestras de harina integral, pero mostró un aumento significativo (superior al 24 %) en los polifenoles presentes en la FU, dando como resultado global (FL + FU) un aumento de entre 7 % y 20 % para las variedades ACA 315 y BIOINTA 3004, respectivamente, con respecto a las harinas correspondientes. El incremento en el porcentaje de polifenoles con respecto a fideos crudos, para la suma de fracciones (FL + FU), fue del 58 % y 81 % para ACA 315 y BIOINTA 3004, respectivamente. Este hecho puede deberse a que el agua a ebullición utilizado en el proceso de cocción podría facilitar una mayor extracción de los compuestos fenólicos unidos (principalmente de derivados de dímeros de ácido ferúlico), a raíz de las transformaciones que sufre la matriz del alimento y, de esta forma, aumentar la cantidad de polifenoles extraídos (Fares *et al.*, 2010). Este último resultado es positivo por dos razones, la primera es porque parte de estos compuestos demostraron ser los responsables de la capacidad antioxidante *in vitro* e *in vivo* en los extractos de trigo entero (analizados en el **Capítulo 3**); la segunda razón tiene que ver con la mayor disponibilidad de estos polifenoles como resultado del proceso de cocción. A partir de esto, se podría suponer que estos polifenoles estarían más biodisponibles para ejercer su acción antioxidante dentro del organismo humano luego de su ingesta.

Adicionalmente al estudio de los cambios en el perfil de compuestos polifenólicos durante la elaboración de fideos integrales secos cocidos, se estudiaron los cambios en las propiedades antioxidantes a través de metodologías *in vitro* (TEAC y FRAP).

En la **Figura 4.3** se muestran los resultados obtenidos de TEAC y FRAP en la FL (A), en la FU (B) y en la FT (C) de las dos variedades de trigo estudiadas.

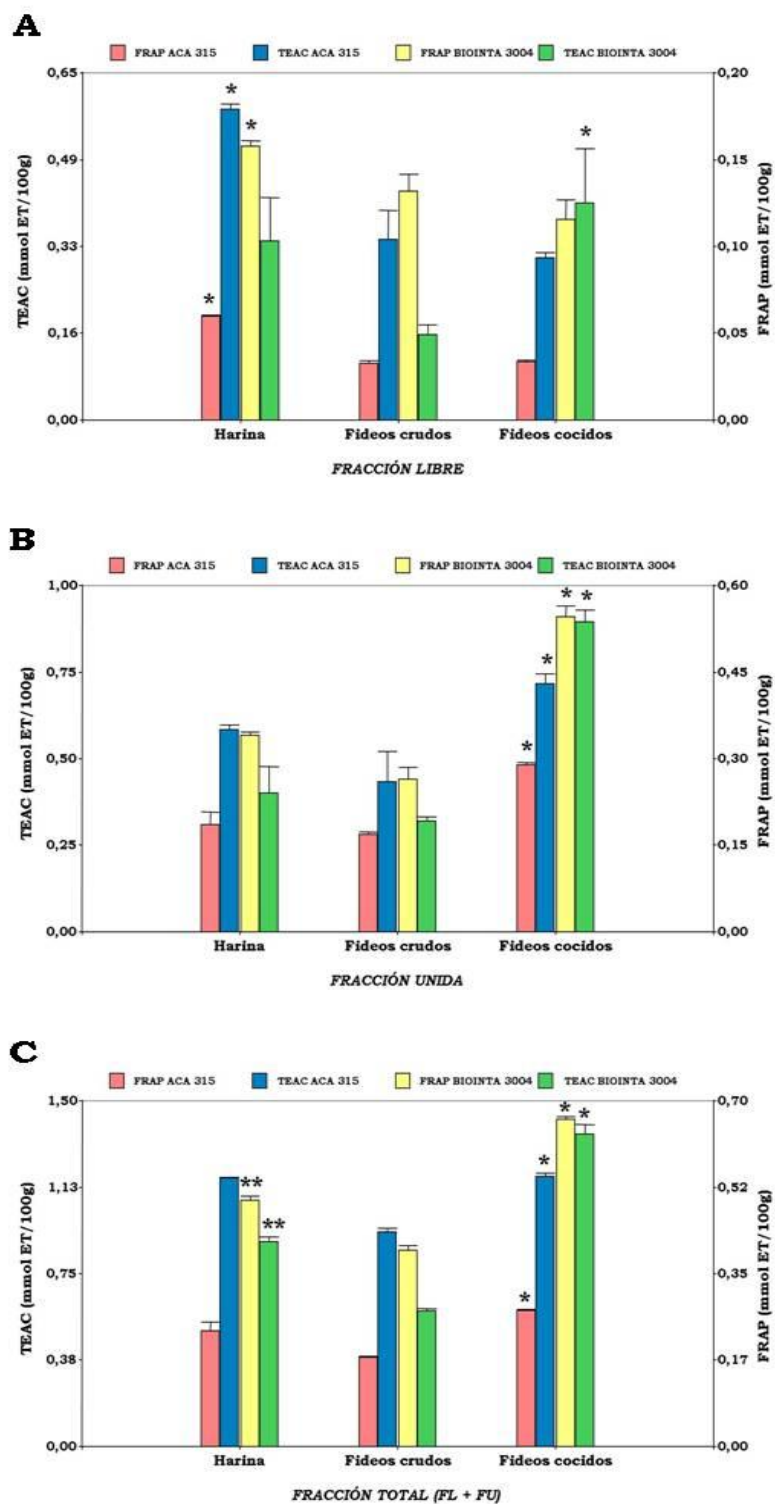


Figura 4.3. Capacidad antioxidante en la FL (A), en la FU (B) y en la FT (C) de las dos variedades de trigo estudiadas. Entre barras del mismo color * indican diferencias significativamente ($p < 0,05$) más altas que el resto. En la figura C, * > **.

Al igual que lo encontrado para el perfil de compuestos polifenólicos, se observó una disminución significativa de la CA evaluada a través TEAC y FRAP en la FL de fideos crudos con respecto a muestras de harina integral (**Figura 4.3 A**), en las dos variedades analizadas. Por otro lado, la FL de fideos integrales cocidos mostró una disminución significativa con respecto a harinas en FRAP para las dos variedades, y en TEAC para la variedad ACA 315, pero no se observaron diferencias significativas con la CA determinada en fideos crudos. Adicionalmente, la CA determinada a través de TEAC en la variedad BIOINTA 3004 mostró un aumento significativo con respecto a harinas y fideos crudos.

En cuanto a la FU (**Figura 4.3 B**), no se observaron cambios significativos en la CA (TEAC y FRAP) de las dos variedades de trigo, entre fideos crudos y harinas, pero sí se observó un aumento significativo en la FU de fideos cocidos con respecto a harinas y fideos crudos.

Analizando la **Figura 4.3 C**, donde se muestran los resultados de CA como la suma de la FL más la FU, para tener una visión más general de lo que sucede en la elaboración de fideos, se observa una disminución significativa de la CA evaluada a través de TEAC y FRAP, en fideos crudos con respecto a harinas. Esta disminución está de acuerdo con lo encontrado en el perfil de compuestos polifenólicos, sobre todo con los compuestos **2** (diglucósido de ácido hidroxibenzoico) y **4** (triptófano) presentes en la FL, y los compuestos **20** y **22** (isómeros 9 y 10 de ácidos diferúlicos, respectivamente) presentes en la FU, los cuales mostraron una gran influencia sobre la CA medida a través de estas dos metodologías (**Capítulo 3, Sección 3.3.2.1**).

Por otro lado, en esta misma figura, se observa que los fideos cocidos mostraron un aumento significativo en la CA en la variedad BIOINTA 3004 con respecto a harinas y fideos crudos, y un aumento significativo en la variedad ACA 315 con respecto a fideos crudos, aunque no se observaron diferencia significativa con la CA determinada en harinas de esta misma variedad. La FU es la que más contribuye a estos resultados, los cuales también pueden ser explicados analizando el perfil de compuestos polifenólicos. Anteriormente se evidenció un aumento en el contenido de compuestos polifenólicos, principalmente de compuestos derivados de ácidos diferúlicos, en fideos cocidos con respecto a fideos crudos y las harinas correspondientes; probablemente debido a una mejor extracción de los polifenoles unidos a macromoléculas como consecuencia de las transformaciones en la matriz del alimento debida al agua en ebullición. Esta sería la razón de la mayor CA encontrada en los fideos cocidos. Esto último fue discutido en el capítulo anterior (**Sección 3.3.2.1**). También Fares *et al.* (2010) evidenciaron una mayor CA (TEAC) en fideos cocidos con respecto a fideos crudos, y la atribuyeron principalmente al incremento observado de ácido ferúlico en la FU de los extractos. Dos años más tarde, Aravind *et al.* (2012) reportaron una conservación de la CA (TEAC) en la FL de fideos cocidos con respecto a fideos crudos.

Los resultados del presente trabajo muestran que la elaboración y cocción de fideos integrales secos producen un cambio en el perfil de compuestos polifenólicos, como así también en su capacidad antioxidante. Si bien hay compuestos que disminuyen a lo largo del procesamiento, hay muchos otros, principalmente los derivados de ácido ferúlico, que se incrementan después de la cocción; es decir que de alguna forma se hacen más fácilmente extraíbles (aumento de la disponibilidad). Los compuestos responsables de la capacidad antioxidante encontrada están más disponibles en la variedad BIOINTA 3004 que en la variedad ACA 315, por lo que se podría pensar que la elaboración de fideos integrales a partir de la variedad BIOINTA 3004 permitirían una mejor biodisponibilidad de estos compuestos dentro del organismo humano, aportando mejores propiedades antioxidantes que las de fideos integrales generados a partir de la variedad ACA 315.

Para verificar esta hipótesis se estudió la bioaccesibilidad, como aproximación a la biodisponibilidad, a través de la simulación del tránsito de este alimento a través del tracto gastro-intestinal, con el fin de evaluar si efectivamente los compuestos presentes en fideos elaborados a partir de la variedad BIOINTA 3004 estaban más bioaccesibles que en los correspondientes a la variedad ACA 315. Los resultados obtenidos se presentan en la próxima sección.

4.3.2. Bioaccesibilidad de polifenoles tras simular una digestión gastro-intestinal.

La bioaccesibilidad de los compuestos antioxidantes presentes en fideos integrales cocidos, como así también los cambios que estos compuestos sufren a lo largo del sistema gastro-intestinal humano, se analizaron en 3 etapas, en la primera se simuló la digestión bucal (BOC), en la segunda se imitó el proceso de digestión en el estómago (GAS), y en la última se simuló la digestión y la absorción de los compuestos polifenólicos en el intestino delgado (INT y ABS). Las submuestras ABS representan la fracción bioaccesible de polifenoles, los cuales pasarían al torrente sanguíneo para llegar al órgano o tejido donde ejercerían su acción antioxidante, mientras que las submuestras INT serían extrapolables a los polifenoles que pasarían al colon.

En la **Tabla 4.3** se muestran los resultados obtenidos de PT y compuestos polifenólicos individuales, correspondientes a las distintas etapas de digestión, para fideos cocidos elaborados a partir de las variedades ACA 315 y BIOINTA 3004.

Tabla 4.3. Contenido de PT (mg EAG/100g) y compuestos polifenólicos individuales (mg/100g), en las distintas etapas de digestión, de fideos cocidos elaborados a partir de la variedad ACA 315 y de la variedad BIOINTA 3004.

Compuesto	BOC	GAS	INT	ABS
ACA 315				
2	106 ± 16 b	141 ± 7 a	24 ± 3 d	59 ± 3 c
3	108 ± 18 c	126 ± 19 c	215 ± 11 b	1159 ± 24 a
4	11,3 ± 0,3 b	1,86 ± 0,13 d	4,4 ± 0,6 c	31,8 ± 1,4 a
5	< LC	0,90 ± 0,03 a	0,051 ± 0,023 b	< LD
6	0,0196 ± 0,0017 a	0,0063 ± 0,0009 b	< LC	< LC
8	0,0401 ± 0,0006 a	0,0120 ± 0,0009 b	0,0007 ± 0,0007 c	< LC
13	2,84 ± 0,12 a*	2,06 ± 0,07 b*	0,70 ± 0,12 c	0,8 ± 0,3 c
16	0,33 ± 0,05 a	0,116 ± 0,007 b	< LD	< LD
17	0,36 ± 0,05 b	< LC	< LC	0,64 ± 0,04 a
PT	2,75 ± 0,17 c	213 ± 8 a	211,0 ± 2,5 a	102 ± 6 b
BIOINTA 3004				
2	116 ± 19 a	110 ± 30 a	26,6 ± 1,1 b	54 ± 5 c
3	111 ± 25 c	127 ± 17 c	212 ± 5 b	1280 ± 120 a
4	10,6 ± 1,4 b	1,7 ± 0,4 d	5,38 ± 0,19 c	27,9 ± 1,6 a
5	< LC	0,71 ± 0,11 a	0,012 ± 0,011 b	< LC
6	0,041 ± 0,005 a*	0,0181 ± 0,0015 b*	0,0034 ± 0,0021 c	< LC
8	0,075 ± 0,008 a*	0,02928 ± 0,00003 b*	0,019 ± 0,004 c*	0,0181 ± 0,0014 c*
13	1,2 ± 0,5 a	1,06 ± 0,07 a	0,31 ± 0,12 b	0,032 ± 0,022 c
16	0,07 ± 0,10 b	0,104 ± 0,015 a	< LD	< LD
17	0,31 ± 0,04	< LC	< LC	0,5 ± 0,4
PT	6,2 ± 0,9 c	203,4 ± 2,4 a	197 ± 4 a	88 ± 9 b

< LD significa menor al límite de detección y < LC menor al límite de cuantificación. LD metodológico (mg/100g): 5 (0,01) y 16 (0,002). LC metodológico (mg/100g): 5 (0,03), 6 (0,002), 8 (0,002) y 17 (0,13). Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las distintas etapas analizadas. * indican diferencias significativas entre variedades.

Los resultados obtenidos mostraron que solo 9 de los 25 compuestos identificados y cuantificados en fideos integrales cocidos, elaborados a partir de las dos variedades analizadas (Tablas 4.1 y 4.2), pudieron ser cuantificados en alguna de las 3 etapas analizadas de la digestión *in vitro*. Ocho de estos compuestos (2, 3, 4, 5, 6, 8, 13, 16 y 17) fueron anteriormente cuantificados en la FL de fideos cocidos (Tablas 4.1 y 4.2), mientras que el compuesto 17 y el compuesto 16 fueron cuantificados en la FU correspondiente. No obstante, las concentraciones encontradas de estos últimos polifenoles en las fracciones procedentes de la digestión intestinal, fueron muy inferiores a las determinadas en fideos cocidos. Mateo Anson *et al.* (2009), demostraron que la concentración de ácido ferúlico encontrada después de simular una digestión *in vitro*, y posterior dializado, provenía de la FL de polifenoles presentes en pan. A partir de este dato de literatura se puede suponer que el contenido de ácido *trans*-ferúlico encontrado en este trabajo corresponde al ácido ferúlico cuantificado en la FL de fideos cocidos (0,62 mg/100g y 0,310 mg/100g para la variedad ACA 315 y BIOINTA 3004, respectivamente). El resto de los polifenoles cuantificados en la FU de fideos integrales cocidos, no pudieron ser identificados o cuantificados en ninguna de

las etapas analizadas de la digestión *in vitro*. Este último resultado implicaría que la mayor parte de los polifenoles procedentes de la FU en fideos cocidos no está bioaccesible para su utilización por parte del organismo.

El análisis individual de cada uno de los 9 compuestos cuantificados mostró que el compuesto **3** presentaba un aumento significativo en su concentración durante la simulación de la digestión y posterior dializado, mientras que los compuestos **2**, **6**, **8**, **13** y **16** sufrieron una disminución significativa a lo largo de la simulación (**Tabla 4.3**). Los compuestos **4** (triptófano) y **17**, en cambio, mostraron una disminución significativa entre la digestión bucal y la gástrica, y un aumento significativo durante la etapa de dializado (submuestras ABS). Solo cinco de estos compuestos (**2**, **3**, **4**, **13** y **17**) en la variedad ACA 315, y estos mismos cinco, más el compuesto **8** en la variedad BIOINTA 3004, pudieron ser cuantificados en la submuestra ABS. Estos compuestos serían los que están potencialmente biodisponibles para ejercer su efecto sobre la salud humana.

Hasta el momento de escribir esta tesis no se encontraron trabajos que estudien la bioaccesibilidad o biodisponibilidad de los compuestos **2**, **3**, **4**, **8** y **13** en alimentos derivados de trigo. Algunos trabajos que estudiaron la biodisponibilidad de ácidos polifenólicos en cereales y productos derivados de estos, encontraron una baja biodisponibilidad de ácido ferúlico en humanos (Kern *et al.*, 2003) y en ratas (Adam *et al.*, 2002). Por otro lado, Mateo Anson *et al.* (2009) reportaron una baja bioaccesibilidad de este compuesto (menor al 1-2 %) en salvado y aleurona de trigo, determinada a través de un modelo de digestión *in vitro*. Este último resultado está de acuerdo a lo encontrado en esta tesis, donde el ácido *trans*-ferúlico mostró una bioaccesibilidad promedio del 4,5 %.

No se encontraron diferencias significativas entre fideos integrales cocidos elaborados a partir de ambas variedades de trigo, lo que contradice la hipótesis planteada en la sección anterior. Esta contradicción puede deberse a que los compuestos que estaban más disponibles para ser extraídos en fideos cocidos elaborados a partir de la variedad BIOINTA 3004, principalmente los dímeros de ácido ferúlico, parecen no haber sido liberados de la matriz del alimento en la simulación de la digestión buco-gastro-intestinal; o por lo menos, no pudieron ser detectados a lo largo de la misma.

Algunos autores que hicieron evaluaciones de biodisponibilidad, encontraron que los ácidos ferúlicos esterificados a macromoléculas (FU), eran poco absorbidos en el intestino delgado (Belobrajdic & Bird, 2013; Mateo Anson *et al.*, 2009; Z. Zhao & Moghadasian, 2009), lo que está de acuerdo a los resultados encontrados en esta tesis. Por otro lado, hay evidencias de que estos compuestos, unidos principalmente a fibras alimentarias, sobreviven a la digestión en el intestino delgado, y pasarían al colon, donde la fermentación de las fibras permitirían la liberación de estos compuestos, ejerciendo su acción antioxidante sobre el intestino grueso (Andreasen *et al.*, 2001; Liu, 2007; Vitaglione *et al.*, 2008). De hecho existen estudios epidemiológicos que demuestran una menor incidencia de cáncer de colon cuando hay un alto consumo en cereales integrales (Larsson *et al.*, 2005; Schatzkin *et al.*, 2008). Por lo que, realizar un ensayo con bacterias provenientes del colon,

simulando la fermentación intestinal, sería necesario para completar este trabajo, y poder determinar si efectivamente los compuestos asociados a la FU de fideos integrales cocidos, elaborados a partir de la variedad BIOINTA 3004, están más biodisponibles para ejercer su acción antioxidante sobre el organismo humano, que aquellos elaborados a partir de la variedad ACA 315.

Para evaluar la acción antioxidante de los compuestos polifenólicos a lo largo de la digestión gastro-intestinal y posterior absorción intestinal, se determinó la capacidad antioxidante de las distintas submuestras a través de los métodos químicos TEAC y FRAP. La determinación a través de TEAC mostró una mayor capacidad antioxidante de los compuestos presentes en GAS e INT para fideos elaborados a partir de las dos variedades estudiadas (**Figura 4.4**), mientras que FRAP mostró mayor CA en las submuestras INT (**Figura 4.5**).

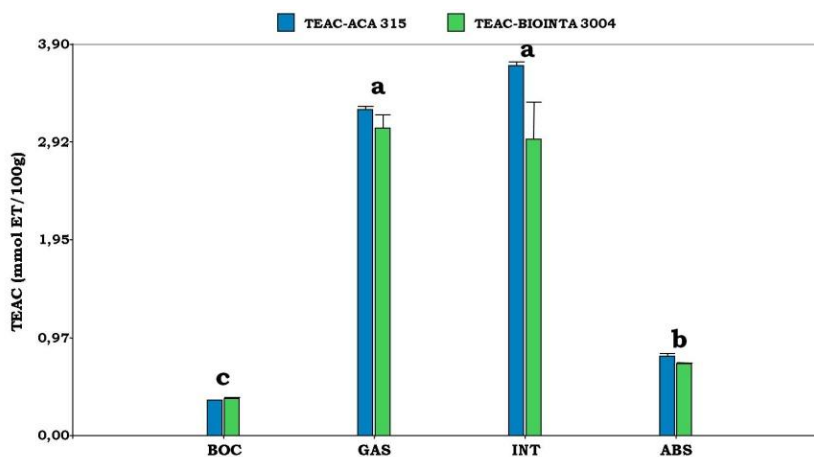


Figura 4.4 CA determinada a partir de TEAC en distintas etapas de la digestión gastro-intestinal *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

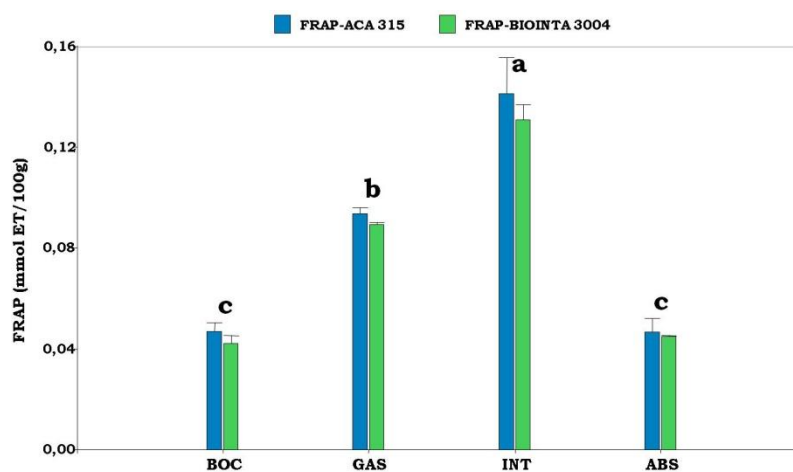


Figura 4.5 CA determinada a partir de FRAP en distintas etapas de la digestión gastro-intestinal *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Estos resultados estarían indicando que los compuestos polifenólicos con mayor acción antioxidante en fideos integrales secos cocidos elaborados a partir de trigo argentino, no serían capaces de atravesar la membrana intestinal. Estos compuestos pasarían al colon, donde la fermentación de las fibras alimentarias permitiría su liberación, aunque esta hipótesis no pudo ser corroborada durante esta tesis.

4.4. CONCLUSIONES.

En este capítulo se estudió el perfil de compuestos polifenólicos y la capacidad antioxidante (CA) en distintas etapas de la elaboración de fideos integrales secos cocidos a partir de dos variedades de trigo, ACA 315 y BIOINTA 3004. Los resultados obtenidos mostraron que la elaboración y cocción de fideos produce un cambio en el perfil de compuestos polifenólicos y en la CA de las muestras. Las etapas de amasado, laminado y secado producen una disminución de la capacidad antioxidante, probablemente debido a la degradación de compuestos polifenólicos (libres y unidos), mientras que la cocción de la pasta produce un aumento de la capacidad antioxidante, probablemente debido a que el agua en ebullición transforma la matriz del alimento, mejorando la disponibilidad de polifenoles, principalmente los derivados del ácido ferúlico, favoreciendo la extracción posterior de estos.

Adicionalmente, se estudió la bioaccesibilidad, como aproximación de la biodisponibilidad, de los compuestos polifenólicos presentes en fideos integrales secos cocidos. Los resultados obtenidos mostraron que solo 5 de los 25 compuestos cuantificados en estos, lograron atravesar la membrana de diálisis. Estos compuestos fueron cuantificados en la FL de extractos de fideos cocidos, mientras que ninguno de los compuestos identificados en la FU de los mismos pudo ser detectado en las distintas etapas evaluadas de la digestión gastro-intestinal y posterior absorción. Estos compuestos ejercerían su acción antioxidante en el colon.



CONCLUSIONES FINALES

Esta tesis buscó contribuir al estudio y la valoración comercial y nutricional de trigo argentino mediante la evaluación de sus perfiles químicos característicos y sus propiedades antioxidantes.

El estudio de 36 variables diferentes junto con el uso de métodos estadísticos multivariados (AC, ACP y ADS) evidenció que las muestras de trigo argentino estudiadas poseen un perfil característico de elementos e isótopos, y que dicho perfil depende de la región donde es cultivado. Estos resultados permiten verificar la procedencia geográfica, dando sustento al concepto de trazabilidad química de alimentos, lo que presupone un aporte a la comercialización de trigo argentino con mayor certeza sobre su procedencia.

En cuanto a la valoración nutricional del trigo, se estudió el contenido y perfil cuali-cuantitativo de compuestos polifenólicos en distintas variedades de trigo argentino, procedente de distintas regiones del país. Esta parte de la tesis buscó identificar aquellos genotipos con mayor contenido en estos compuestos, promoviendo el estudio a futuro de las bases genéticas de los caracteres asociados a la generación de estos compuestos con mejores propiedades antioxidantes. Los análisis de polifenoles totales (PT) y del perfil de polifenoles por HPLC-DAD-ESI-QTOF, permitieron identificar dos variedades (ACA 315 y KLEIN GUERRERO) con estas propiedades.

En cuanto a la determinación de la CA, la variedad ACA 315 demostró la mayor CA, con respecto al resto, usando métodos *in vitro* (TEAC y FRAP) para evaluarla. Sin embargo, el estudio de la CA *in vivo*, utilizando un modelo de microorganismos (*S. cerevisiae*), mostró que la variedad BIOINTA 3004 presentaba mejores propiedades antioxidantes *in vivo* con respecto a la variedad ACA 315, pese a tener menores cantidades de compuestos polifenólicos y también menor CA *in vitro* (TEAC y FRAP). A partir de este resultado se concluye que el mayor contenido en compuestos polifenólicos, tanto como una mayor CA *in vitro*, no necesariamente reflejan la acción antioxidante de un compuesto o extracto sobre un organismo vivo.

Junto con la evaluación de CA *in vitro* e *in vivo*, se buscó determinar el efecto que tiene el procesamiento del trigo sobre los compuestos polifenólicos y sus propiedades antioxidantes. Para ello se estudiaron los cambios en el perfil de polifenoles, junto a la CA del trigo, durante el proceso de formación de una pasta (fideos integrales secos) a partir de una harina integral de trigo, sumado al estudio de los efectos de la cocción de estos fideos sobre la CA y el perfil de polifenoles. Los resultados obtenidos demostraron que el procesamiento (producción de harina, posterior amasado y cocción) del trigo produce un cambio en el perfil de polifenoles y en la CA del trigo. Estos cambios resultan beneficiosos debido a que la etapa de cocción mejora la disponibilidad de compuestos polifenólicos, particularmente de aquellos derivados de ácidos ferúlicos asociados a la fracción de polifenoles unidos (FU), generando mejores propiedades antioxidantes en los fideos integrales cocidos, especialmente los producidos a partir de la variedad BIOINTA 3004.

El estudio de la estabilidad y bioaccesibilidad de los compuestos antioxidantes en fideos integrales cocidos, utilizando un modelo experimental que simula la digestión gastro-

intestinal humana y posterior absorción, mostró que sólo una pequeña fracción de compuestos polifenólicos, asociados a la fracción libre (FL), podría ser absorbida por el intestino delgado. Esto no ocurrió con los polifenoles asociados a la FU, sugiriendo que éstos podrían ejercer su acción antioxidante en el colon. Esta fracción de polifenoles unidos (FU) tendrían mejores propiedades antioxidantes, ya que mostraron mayor CA *in vitro*. Este último resultado señala la necesidad de completar el estudio sobre el aprovechamiento metabólico de los polifenoles del trigo, incluyendo su proceso en el colon, su presencia en plasma, etc., lo cual está fuera del alcance de esta tesis.

Todos los resultados obtenidos en esta tesis demostraron que el trigo argentino posee propiedades antioxidantes comparables a otros alimentos generalmente asociados con una gran CA. Sin embargo, entender como los compuestos bioactivos presentes en él ejercen su efecto beneficioso sobre el organismo humano, requiere un entendimiento completo de sus estructuras químicas, los cambios durante la elaboración de alimentos derivados de trigo, su metabolismo y biodisponibilidad, las propiedades biológicas, y los efectos que tienen sobre la salud humana.

El verdadero rol antioxidante del trigo, y de otros alimentos, debe entonces ser estudiado en una manera mucho más integral y compleja, que trasciende la mera determinación empírica de la CA medida por métodos químicos *in vitro*, o el modelo de evaluación *in vivo* a través de un microorganismo, utilizados en esta tesis.

Por último se concluye que el estudio de las propiedades antioxidantes de los alimentos debe contemplar la composición cuali-cuantitativa de polifenoles y otros antioxidantes presentes en el alimento de partida, la influencia de los cambios tecnológicos (manufactura) sobre esta composición, su metabolismo, biodisponibilidad, absorción y distribución.



ANEXO I

1. QUIMIOMETRÍA

Una herramienta muy utilizada para el tratamiento de datos en alimentos, y otras áreas, es la **Quimiometría**. Massart (1998) la definió como “la disciplina química que utiliza la matemática, la estadística y la lógica formal para diseñar o seleccionar procedimientos experimentales óptimos, proporcionar la máxima información química relevante a partir del análisis de datos químicos, y obtener conocimientos a partir de sistemas químicos”.

Actualmente la quimiometría se aplica a través del uso de software estadísticos capaces de manejar una gran colección de datos, tratarlos y aplicar técnicas estadísticas muy complejas de forma fácil y rápida.

1.1. Estadística descriptiva.

Generalmente los datos registrados en un proceso de medición son tratados, en un primer momento, con el objetivo de describir y resumir sus características más sobresalientes. Esto se conoce como **Estadística Descriptiva** y generalmente se basa en la obtención de medidas resumen como la media, la varianza, la desviación estándar, los valores máximos y mínimos, entre otros.

1.2. Estadística inductiva: Análisis de la Varianza.

El análisis de la varianza (ANOVA) es una de las herramientas de inferencia estadística, o estadística inductiva, más utilizada en las investigaciones científico-técnicas de las ciencias naturales. Es un método estadístico que permite comparar simultáneamente varias medias (procedentes de distintos grupos de muestra). Las medias se comparan para establecer si son todas iguales, o si al menos una de ellas es distinta de las demás (Ramis Ramos & García Álvarez-Coque, 2001), con lo cual el grupo o grupos asociados a dichas medias podrán diferenciarse. La aplicación de este análisis implica el cumplimiento de 3 supuestos:

- ✓ **Independencia:** los datos de una serie no deben estar correlacionados con los de otra;
- ✓ **Normalidad:** la distribución de los datos de cada serie tiene que ser normal;
- ✓ **Homogeneidad:** las varianzas de las series deben ser iguales.

1.3. Estadística Multivariada.

La estadística multivariada se utiliza para **evaluar simultáneamente** tres o más variables medidas en una misma muestra. Un análisis estadístico multivariado puede realizarse a tres niveles: cualitativo (o exploratorio), clasificatorio y cuantitativo.

1.3.1. *Análisis multivariado exploratorio.*

Las técnicas de exploración de datos se utilizan para descubrir y resaltar la información contenida en una matriz multidimensional de datos. En esta tesis los análisis exploratorios utilizados fueron el análisis de correlación simple de Pearson, el análisis de conglomerados, el análisis de componentes principales y el análisis de procrustes generalizado.

1.3.1.1. Análisis de correlación simple (ACSP).

Se realiza un análisis de correlación simple de Pearson con el fin de obtener una medida de la magnitud de la asociación lineal entre dos variables. Coeficientes de correlación próximos a la unidad y positivos señalan un perfil similar entre las variables afectas; si el coeficiente es negativo y próximo a la unidad señalan perfiles opuestos entre esas variables, indicando que ambas no son independientes, sino que se asocian de algún modo.

1.3.1.2. Análisis de conglomerados (AC).

El AC (del Inglés, *Cluster Analysis*) es una técnica de agrupamiento de objetos (observaciones o variables). Se usa para agrupar observaciones, variables o entidades de un conjunto de datos en base a sus semejanzas o diferencias. Las variables son las características con respecto a las cuales los objetos varían entre sí y que permiten diferenciarlos.

El propósito del análisis es ubicar a los objetos en grupos o clusters sugeridos por los datos, no definidos “a priori”, tal que los objetos en un grupo dado tiendan a ser semejantes en algún aspecto y los objetos en diferentes grupos tiendan a ser distintos. Generalmente se utiliza para conocer el número de grupos y la estructura latente.

Para medir la asociación entre las entidades a agrupar, es necesario establecer una medida de similitud. En la formación de grupos, la proximidad está dada por algún tipo de distancia. La selección de una medida de distancia apropiada es fundamental en el uso de cualquier técnica de agrupamiento. Esta elección depende de la naturaleza de las variables y del conocimiento del objeto de estudio.

En el análisis de conglomerados se utilizan técnicas de clasificación jerárquica y no-jerárquica. Las técnicas de agrupamiento jerárquicas están organizadas de tal manera que un cluster puede estar contenido completamente dentro de otro cluster, pero no está permitido otro tipo de superposición entre ellos. Los objetos similares se agrupan primero y esos grupos iniciales son luego unidos de acuerdo a sus similitudes. Como las diferencias van disminuyendo, al final todos los subgrupos formarán un solo grupo. Los resultados del agrupamiento se muestran en un diagrama de árboles en dos dimensiones (*dendrograma*), en el que se observan las uniones y/o divisiones que se van realizando en cada nivel del proceso de construcción de conglomerados. Los objetos en un mismo grupo comparten el mayor número permisible de características y los objetos en diferentes grupos tienden a ser distintos (Rebolo *et al.*, 2000).

1.3.1.3. Análisis de componentes principales (ACP).

El ACP permite analizar la interdependencia de variables métricas y encontrar una representación gráfica óptima de la variabilidad de los datos. Esta análisis examina todos los datos en un espacio de menor dimensión que el espacio original de las variables, y trata de encontrar, con mínima pérdida de información, un nuevo conjunto de variables (componentes principales) no correlacionadas que expliquen la estructura de la variación entre objetos y variables (Balzarini *et al.*, 2008).

1.3.1.4. Análisis de Procrustes Generalizado (APG).

El APG construye la configuración de consenso de un conjunto de datos mediante la aplicación de transformaciones en un intento de superponerlos. Este análisis representa, por técnicas de coordenadas principales, la estructura y la relación entre objetos a los cuales se les ha medido diferentes variables. Permite ver si diferentes grupos de variables describen a un objeto de la misma forma (Balzarini *et al.*, 2008).

1.3.2. Análisis multivariado clasificatorio: Análisis discriminante (AD).

En un análisis clasificatorio se construyen modelos capaces de pronosticar la pertenencia de un objeto a una categoría sobre la base de las características del objeto. La matriz de datos contiene al menos una variable categórica, que indica la categoría a la que pertenece cada objeto y que constituye la respuesta o variable que se quiere predecir, y una o más variables de escala que describen otras tantas características de los objetos y que se utilizan como variables predictoras (Ramis Ramos & García Álvarez-Coque, 2001).

Dentro de este tipo de análisis se encuentra el análisis discriminante (AD), el cual utiliza un algoritmo que busca combinaciones lineales o cuadráticas de las variables

manifiestas que maximizan la varianza entre categorías, a la vez que minimizan las varianzas intra-categorías.

El AD construye una ecuación que contiene una combinación lineal de variables (ponderadas a partir de su importancia relativa para el comportamiento del conjunto) la cual permite luego discriminar en función de un cierto número de parámetros medidos, cuantificando las diferencias entre los distintos grupos e identificando los parámetros más fuertes asociados con dichas diferencias.

El AD utilizado en esta tesis fue el análisis discriminante paso a paso “*stepwise*” (ADS), el cual sirve para determinar la variable o el conjunto de variables que mejor discriminan entre dos o más grupos que ocurren naturalmente. El procedimiento *stepwise* es guiado por los valores respectivos del estadístico F para incluir o eliminar las variables del modelo. El valor F de cada variable indica su significancia estadística en la discriminación entre los grupos, es decir mide hasta qué punto la variable realiza una contribución única para predecir la pertenencia de la muestra a un dado grupo. En general se elegirán las variables cuyos valores de F para inclusión son mayores al valor de corte, y se dejarán afuera aquellas variables del modelo cuya significancia sea menor a la especificada en el F para eliminar.

1.3.3. *Análisis multivariado cuantitativo.*

En un estudio cuantitativo se construyen modelos de regresión, capaces de predecir unas variables a partir de otras. Entre los métodos incluidos en esta categoría se encuentran: el análisis de correlación canónica y los boosted regression trees.

1.3.3.1. Análisis de correlación canónica (ACC).

El ACC se utiliza para determinar la relación lineal entre dos grupos de variables métricas, un grupo de variables independientes y otro grupo de variables dependientes. Esto es, dadas dos o más variables X y dos o más variables Y, se quiere describir la asociación entre estos dos conjuntos o grupos de variables.

Este análisis provee una medida de correlación entre una combinación lineal de las variables en un conjunto (p variables X), con una combinación lineal de las variables en el otro conjunto (m variables Y).

En un primer paso el análisis determina el par de combinaciones lineales con máxima correlación. En un segundo paso, identifica el par con máxima correlación entre todos los pares no correlacionados con el par de combinaciones seleccionadas en el primer paso y así sucesivamente. Las combinaciones lineales de un par son llamadas *variables canónicas* y la correlación entre ellas es llamada *correlación canónica*. El coeficiente de correlación canónica obtenido al cuadrado representa la proporción de la varianza total explicada por cada variable canónica.

1.3.3.2. ***Boosted regression trees (BRT).***

El análisis de BRT es un método de ensamblaje relativamente nuevo que baraja la perspicacia y la técnica tanto de la estadística tradicional como del aprendizaje de computadora (*machine-learning*), y que busca predecir una variable regresora a partir de dos o más variables predictoras. El método BRT difiere del método de regresión tradicional en que, a través de la técnica de *boosting*, genera un único modelo (“mejor”) a partir de la combinación de un gran número de modelos simples (árboles de clasificación-regresión) para optimizar el rendimiento predictivo del modelo final (BRT) (Elith *et al.*, 2008). Este modelo provee una ganancia significativa en el rendimiento predictivo comparado con el análisis de regresión múltiple, ya que es robusto a la colinealidad de las variables, a los datos anómalos, a la falta de datos y puede incluir tanto variables categóricas como continuas. Adicionalmente tiene la habilidad de modelar respuestas no lineales y detectar y modelar las interacciones entre las variables (Leathwick *et al.*, 2008).

A diferencia de los modelos de regresión convencionales, el análisis de BRT se enfoca en la exactitud predictiva en vez del valor p para indicar la significancia de los coeficientes del modelo.



ANEXO II

Tabla II.1. Cuantificación de polifenoles en la FL y en la FU de extractos de trigo en cuatro zonas diferentes (SUB I, SUB IIN, SUB IV y SUB VN).

Compuesto	Zona			
	SUB I	SUB IIN	SUB IV	SUB VN
Fración Libre				
1 ác. 2-hidroxi-3-O-β-D-glucopiranosilbenzoico	0,10 ± 0,06 a	0,06 ± 0,05 a	0,10 ± 0,11 a	0,02 ± 0,04 b
2 diglucósido de ácido hidroxibenzoico	11 ± 3 b	13 ± 6 b	12 ± 4 b	16 ± 3 a
3 glucósido de ácido hidroxibenzoico	25 ± 7 b	29 ± 10 a	22 ± 7 b	30 ± 3 a
4 triptófano	4 ± 4 b	6,1 ± 2,4 a	5 ± 3 a	3 ± 4 b
5 crisoeriol-6,8-di-C-pentósido	0,013 ± 0,010 b	0,014 ± 0,009 b	0,019 ± 0,013 a	0,014 ± 0,008 b
6 8-C-glucosil-6-C-arabinosil-apigenina	0,6 ± 0,3 a	0,5 ± 0,4 b	0,51 ± 0,51 b	0,6 ± 0,3 a
8 6-C-glucosil-8-C-arabinosil-apigenina	0,30 ± 0,15 b	0,33 ± 0,16 b	0,32 ± 0,30 b	0,36 ± 0,14 a
10 ác. diferúlico (isómero 3)	0,26 ± 0,23 b	0,25 ± 0,18 b	0,41 ± 0,19 a	0,41 ± 0,19 a
11 ác. diferúlico (isómero 4)	1,0 ± 0,4 a	0,6 ± 0,4 b	1,1 ± 0,5 a	1,2 ± 0,4 a
13 ác. diferúlico (isómero 6)	1,9 ± 0,7 b	1,6 ± 0,9 b	2,9 ± 1,3 a	2,4 ± 0,7 a
17L ác. <i>trans</i> -ferúlico	0,3 ± 0,5 a	0,23 ± 0,07 b	0,31 ± 0,08 a	0,27 ± 0,06 a
21 <i>p</i> -coumaroil-feruloilputrescina	0,12 ± 0,12 b	0,19 ± 0,3 a	0,2 ± 0,4 a	0,22 ± 0,20 a
Fración Unida				
7 ác. diferúlico (isómero 1)	1,3 ± 0,7 b	1,2 ± 0,5 b	1,9 ± 1,0 a	1,4 ± 0,7 b
9 ác. diferúlico (isómero 2)	2,6 ± 1,2 b	2,8 ± 1,3 b	5 ± 4 a	2,8 ± 1,8 b
12 ác. diferúlico (isómero 5)	3,4 ± 1,7 b	2,9 ± 1,3 b	5 ± 4 a	3,4 ± 1,6 b
14 ác. diferúlico (isómero 7)	4,4 ± 1,6 b	4,1 ± 1,8 b	8 ± 6 a	6 ± 3 a
15 ác. cumárico	0,44 ± 0,14 b	0,60 ± 0,18 a	0,8 ± 0,5 a	0,58 ± 0,16 a
16 derivado de ác. ferúlico	2,3 ± 0,7 b	2,9 ± 0,9 a	1,2 ± 0,7 b	2,2 ± 0,7 c
17 ác. <i>trans</i> -ferúlico	19 ± 5 a	20 ± 5 a	17 ± 6 b	20 ± 5 a
18 ác. <i>cis</i> -ferúlico	4,2 ± 1,5 b	3,7 ± 1,3 b	4,9 ± 2,6 a	5,3 ± 1,6 a
19 ác. diferúlico (isómero 8)	5 ± 3 b	4,4 ± 2,0 b	9 ± 6 a	4,9 ± 2,5 b
20 ác. diferúlico (isómero 9)	10 ± 4 b	12 ± 4 b	17 ± 10 a	12 ± 5 b
22 ác. diferúlico (isómero 10)	4,2 ± 2,3 b	4,9 ± 2,2 b	9 ± 7 a	5 ± 3 b
23 ác. triferúlico	1,6 ± 1,1 b	2,0 ± 0,9 a	2,8 ± 2,4 a	2,2 ± 1,1 a
24 ác. diferúlico (isómero 11)	5,2 ± 2,3 b	5,5 ± 2,4 b	10 ± 7 a	7 ± 3 a
25 ác. diferúlico (isómero 12)	2,0 ± 0,9 b	2,8 ± 1,0 a	3,5 ± 2,3 a	2,8 ± 1,6 a

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en la misma fila: a > b > c.

Tabla II.2. CA en la FL, en la FU y en la FT (FL + FU) de extractos de trigo en cuatro zonas diferentes (SUB I, SUB IIN, SUB IV y SUB VN).

CA	Fracción	Zona			
		SUB I	SUB IIN	SUB IV	SUB VN
FRAP	FL	0,23 ± 0,04 a	0,20 ± 0,04 b	0,22 ± 0,05 a	0,22 ± 0,06 a
	FU	0,35 ± 0,08 b	0,35 ± 0,06 b	0,40 ± 0,09 a	0,37 ± 0,10 b
	FT	0,59 ± 0,10 b	0,55 ± 0,09 b	0,62 ± 0,11 a	0,59 ± 0,13 b
TEAC	FL	0,65 ± 0,08 a	0,63 ± 0,09 a	0,57 ± 0,17 b	0,60 ± 0,10 a
	FU	0,64 ± 0,10 a	0,62 ± 0,11 b	0,6 ± 0,3 b	0,66 ± 0,16 a
	FT	1,29 ± 0,15 a	1,25 ± 0,16 a	1,2 ± 0,4 b	1,26 ± 0,19 a

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en la misma fila: a > b.

The image features a background of a wheat field. The top half shows a close-up of a single wheat ear with its awns, set against a bright, hazy sky. The bottom half shows a vast field of wheat stretching towards the horizon. A vertical strip of vibrant green, showing a close-up of wheat leaves and a developing ear, runs along the right edge of the page.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Abad-García, B.; Berrueta, L. A.; Garmón-Lobato, S.; Gallo, B.; & Vicente, F. (2009). A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216, 5398–5415.
- Acosta-Estrada, B.; Gutiérrez-Urbe, J.; & Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152, 46–55.
- Adam, A.; Crespy, V.; Leurat-Verny, M. A.; Leenhardt, F.; Levillet, M.; Demigné, C.; & Rémésy, C. (2002). The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than metabolism in intestine and liver in rats. *The Journal of Nutrition*, 132, 1962–1968.
- Adom, K. K.; & Liu, R. H. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6182–7.
- Adom, K. K.; Sorrells, M. E.; & Liu, R. H. (2003). Phytochemical profiles and antioxidant activity of wheat varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7825–34.
- Adom, K. K.; Sorrells, M. E.; & Liu, R. H. (2005). Phytochemicals and Antioxidant Activity of Milled Fractions of Different Wheat Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2297–2306.
- Aguilar, E. G.; Cantarelli, M.; Marchevsky, E. J.; Escudero, N. L.; & Camiña, J. M. (2011). Multielemental analysis and classification of amaranth seeds according to their botanical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 9059–64.
- Almeida, C. M. R.; & Vasconcelos, M. T. S. D. (2003). Multielement composition of wines and their precursors including provenance soil and their potentialities as fingerprints of wine origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4788–98.
- Alvarez-Jubete, L.; Wijngaard, H.; Arendt, E. K.; & Gallagher, E. (2010). Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chemistry*, 119, 770–778.
- Andreasen, M. F.; Kroon, P. A.; Williamson, G.; & García-Conesa, M.-T. (2001). Intestinal release and uptake of phenolic antioxidant diferulic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 31, 304–314.
- Aravind, N.; Sissons, M.; Egan, N.; & Fellows, C. (2012). Effect of insoluble dietary fibre addition on technological, sensory, and structural properties of durum wheat spaghetti. *Food Chemistry*, 130, 299–309.
- Arrúa, R. C.; Fabani, M. P.; Vázquez, F.; Diaz, M. P.; & D.A., W. (2006). Evaluation of Mineral Profile Coupled to Chemometrics to Assess the Geographical Origin of Argentine Wines. En *II Meeting of TRACE Project EU*. (Accesible en: <http://www.trace.eu.org/je/posters>). Praga, República Checa.
- Arts, M. J. T. J.; Sebastiaan Dallinga, J.; Voss, H.-P.; Haenen, G. R. M. M.; & Bast, A. (2003). A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures. *Food Chemistry*, 80, 409–414.

Awika, J. M.; Rooney, L. W.; Wu, X.; Prior, R. L.; & Cisneros-Zevallos, L. (2003). Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6657–6662.

B

Baiano, A.; Terracone, C.; Gambacorta, G.; & La Notte, E. (2009). Evaluation of isoflavone content and antioxidant activity of soy-wheat pasta. *International Journal of Food Science & Technology*, 44, 1304–1313.

Balzarini, M. G.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Casanoves, F.; Di Rienzo, J. A.; & Robledo, C. W. (2008). *Manual del Usuario*. Editores: Grupo Infostat. Editorial Brujas. Córdoba, Argentina.

Barberis, N. A. (2014). *Evolución y perspectiva mundial y nacional de la producción y el comercio de trigo*. Informe INTA. Manfredi, Argentina.

Baroni, M. V.; Chiabrando, G. A.; Costa, C.; Fagunde, G.; & Wunderlin, D. A. (2004). Development of a Competitive ELISA for the Evaluation of Sunflower Pollen in Honey Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7222–7226.

Baroni, M. V.; Chiabrando, G. A.; Costa, C.; & Wunderlin, D. A. (2002). Assessment of the Floral Origin of Honey by SDS-Page Immunoblot Techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1362–1367.

Baroni, M. V.; Nores, M. L.; Díaz, M. D. P.; Chiabrando, G. A.; Fassano, J. P.; Costa, C.; & Wunderlin, D. A. (2006). Determination of Volatile Organic Compound Patterns Characteristic of Five Unifloral Honey by Solid-Phase Microextraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry Coupled to Chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7235–7241.

Baroni, M. V.; Podio, N. S.; Badini, R. G.; Inga, M.; Ostera, H. A.; Cagnoni, M.; Gallegos, E.; Gautier, E.; Peral-García, P.; Hoogewerff, J. & Wunderlin, D. A. (2011). How much do soil and water contribute to the composition of meat? A case study: meat from three areas of Argentina. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 11117–28.

Baroni, M. V.; Arrua, C.; Nores, M. L.; Fayé, P.; Díaz, M. del P.; Chiabrando, G. A.; & Wunderlin, D. A. (2009). Composition of honey from Córdoba (Argentina): Assessment of North/South provenance by chemometrics. *Food Chemistry*, 114, 727–733.

Baroni, M. V.; Di Paola Naranjo, R. D.; García-Ferreira, C.; Otaiza, S.; & Wunderlin, D. A. (2012). How good antioxidant is the red wine? Comparison of some in vitro and in vivo methods to assess the antioxidant capacity of Argentinean red wines. *LWT - Food Science and Technology*, 47, 1–7.

Baroni, M. V.; Podio, N. S.; Badini, R.; Inga, C. M.; Ostera, H.; Cagnoni, M., Gautier, E.; Peral-García, P.; Hoogewerff, J. & Wunderlin, D. (2015). Linking soil, water and honey composition to assess the geographical origin of Argentinean honey by multielemental and isotopic analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Enviado.

Bateman, A. S.; Kelly, S. D.; & Jickells, T. D. (2005). Nitrogen Isotope Relationships between Crops and Fertilizer: Implications for Using Nitrogen Isotope Analysis as an Indicator of Agricultural Regime. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5760–5765.

- Baublis, A. J.; Lu, C.; Clydesdale, F. M.; & Decker, E. A. (2000). Potential of wheat-based breakfast cereals as a source of dietary antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*, 19, 308S–311S.
- Bauer, J. L.; Harbaum-Piayda, B.; & Schwarz, K. (2012). Phenolic compounds from hydrolyzed and extracted fiber-rich by-products. *LWT - Food Science and Technology*, 47, 246–254.
- Bednarska, S.; Leroy, P.; Zagulski, M.; & Bartosz, G. (2008). Efficacy of antioxidants in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* correlates with their effects on protein tilos. *Biochimie*, 90, 1476–1485.
- Belobrajdic, D. P.; & Bird, A. R. (2013). The potential role of phytochemicals in wholegrain cereals for the prevention of type-2 diabetes. *Nutrition Journal*, 12, 1–12.
- Benzie, I. F.; & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.
- Bondia-Pons, I.; Aura, A.-M.; Vuorela, S.; Kolehmainen, M.; Mykkänen, H.; & Poutanen, K. (2009). Review: rye phenolics in nutrition and health. *Journal of Cereal Science*, 49, 323–336.
- Branch, S.; Burke, S.; Evans, P.; Fairman, B.; & Wolff Briche, C. S. J. (2003). A preliminary study in determining the geographical origin of wheat using isotope ratio inductively coupled plasma mass spectrometry with ^{13}C , ^{15}N mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 18, 17–22.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 28, 25–30.
- Brazier-Hicks, M.; Evans, K. M.; Gershater, M. C.; Puschmann, H.; Steel, P. G.; & Edwards, R. (2009). The C-glycosylation of flavonoids in cereals. *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 17926–17934.
- Brescia, M. A.; Di Martino, G.; Fares, C.; Di Fonzo, N.; Platani, C.; Ghelli, S.; Reniero, F.; & Sacco, A. (2002). Characterization of Italian Durum Wheat Semolina by Means of Chemical Analytical and Spectroscopic Determinations. *Cereal Chemistry*, 79, 238–242.
- Bullen, T. D.; & Kendall, C. (1998). Tracing of Weathering Reactions and Water Flowpaths: A Multi-isotope Approach. En *Isotope Tracers in Catchment Hydrology*. Editores: C. Kendall & J. J. McDonell. Editorial Elsevier Science B. V. Amsterdam, Países Bajos.
- Bunzel, M.; Ralph, J.; Brüning, P.; & Steinhart, H. (2006). Structural Identification of Dehydrotriferulic and Dehydrotetraferulic Acids Isolated from Insoluble Maize Bran Fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6409–6418.
- Burton, J. H.; Price, T. D.; & Middleton, W. D. (1999). Correlation of Bone Ba/Ca and Sr/Ca due to Biological Purification of Calcium. *Journal of Archaeological Science*, 26, 609–616.
- Bustos, M. C.; Pérez, G. T.; & León, A. E. (2011). Effect of four types of dietary fiber on the technological quality of pasta. *Food Science and Technology International*, 17, 213–21.

C

- Cai, D. L.; Zhang, S. F.; & Zhang, J. (2002). Application of stable carbon and nitrogen isotope methods in ecological studies. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 32, 287–295.
- Callipo, L.; Cavaliere, C.; Fuscoletti, V.; Gubbiotti, R.; Samperi, R.; & Laganà, A. (2010). Phenilpropanoate identification in young wheat plants by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: monomeric and dimeric compounds. *Journal of Mass Spectrometry : JMS*, 45, 1026–1040.
- Camin, F.; Larcher, R.; Nicolini, G.; Bontempo, L.; Bertoldi, D.; Perini, M.; Schlicht, C.; Schellenberg, A.; Thomas, F.; Heinrich, K.; Voerkelius, S.; Horacek, M.; Ueckermann, H.; Froeschl, H.; Wimmer, B.; Heiss, G.; Baxter, M.; Rossmann, A.; & Hoogewerff, J. (2010). Isotopic and elemental data for tracing the origin of European olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 570–577.
- Camin, F.; Larcher, R.; Perini, M.; Bontempo, L.; Bertoldi, D.; Gagliano, G.; Nicolini, G.; & Versini, G. (2010). Characterisation of authentic Italian extra-virgin olive oils by stable isotope ratios of C, O and H and mineral composition. *Food Chemistry*, 118, 901–909.
- Carocho, M.; & Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 51, 15–25.
- Chandrasekara, A.; & Shahidi, F. (2011). Determination of antioxidant activity in free and hydrolyzed fractions of millet grains and characterization of their phenolic profiles by HPLC-DAD-ESI-MSn. *Journal of Functional Foods*, 3, 144–158.
- Cheminet, G. (2013). *Determinación del perfil de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de yerba mate (Ilex paraguariensis)*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Córdoba.
- Chillo, S.; Laverse, J.; Falcone, P. M.; & Del Nobile, M. A. (2008). Quality of spaghetti in base amaranthus wholemeal flour added with quinoa, broad bean and chick pea. *Journal of Food Engineering*, 84, 101–107.
- Chiremba, C.; Taylor, J. R. N.; Rooney, L. W.; & Beta, T. (2012). Phenolic acid content of sorghum and maize cultivars varying in hardness. *Food Chemistry*, 134, 81–88.
- Clifford, M. N. (2004). Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Medica*, 70, 1103–1114.
- Cometto, P. M.; Faye, P. F.; Caccavari, M.; Baroni, M. V.; & Aldao, M. A. J. (2006). Relationship between interannual variation of amino acid profile and pollen content in honey from a small Argentinian region. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9458–9464.
- Cometto, P. M.; Faye, P. F.; Di Paola-Naranjo, R. D.; Rubio, M. A., & Aldao, M. A. J. (2003). Comparison of free amino acids profile in honey from three argentinian regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5079–5087.
- Costa, V.; & Moradas-Ferreira, P. (2001). Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, 22, 217–246.

Cuyckens, F.; & Claeys, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry: JMS*, 39, 1–15.

D

Dambrine, E.; Loubet, M.; Vega, J. A.; & Lissarague, A. (1997). Localisation of mineral uptake by roots using Sr isotopes. *Plant Soil*, 192, 129–132.

Dani, C.; Bonatto, D.; Salvador, M.; Pereira, M. D.; Henriques, J. A. P.; & Eleutherio, E. (2008). Antioxidant protection of resveratrol and catechin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4268–4272.

D'Archivio, M.; Filesi, C.; Vari, R.; Scazzocchio, B.; & Masella R. (2010). Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 1321–1342.

Di Paola-Naranjo, R. D.; Baroni, M. V.; Podio, N. S.; Rubinstein, H. R.; Fabani, M. P.; Badini, R. G.; Inga, M.; Oстера, H. A.; Cagnoni, M.; Gallegos, E.; Gautier, E.; Peral-Garcia, P.; Hoogewerff, J.; & Wunderlin, D. A. (2011). Fingerprints for main varieties of argentinean wines: terroir differentiation by inorganic, organic, and stable isotopic analyses coupled to chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 7854–7865.

Di Rienzo, J. A.; Casanoves, F.; Balzarini, M. G.; González, L.; Tablada, M.; & Robledo, C. W. (2008). InfoStat, versión 2008. Córdoba, Argentina: Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.

Di Rienzo, J. A.; Guzmán, A. W.; & Casanoves, F. (2002). A Multiple-Comparisons Method Based on the Distribution of the Root Node Distance of a Binary Tree. *Journal of Agricultural and Biologic Environment*, 7, 129–142.

Di Rienzo, J. A.; Macchiavelli, R.; & Casanoves, F. (2010). Modelos Mixtos en InfoStat. Córdoba, Argentina: Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.

Dobberstein, D.; & Bunzel, M. (2010). Separation and detection of cell wall-bound ferulic acid dehydrodimers and dehydrotrimers in cereals and other plant materials by reversed phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8927–8935.

Dunn, C. E. (2007). Biogeochemistry in Mineral Exploration. *Handbook of Exploratory Environmental Geochemistry*, 9, 1–460.

E

Elith, J.; Leathwick, J. R.; & Hastie, T. (2008). A working guide to boosted regression trees. *Journal of Animal Ecology*, 77, 802–813.

Elith, J.; Leathwick, J. R.; & Hastie, T. (2008). A working guide to boosted regression trees - Online Appendices. Pág: 1-4.

- Elsayed, N. M. (2001). Antioxidant mobilization in response to oxidative stress: A dynamic environmental-nutritional interaction. *Nutrition*, *17*, 828–834.
- Evans, R. D. (2001). Physiological mechanisms influencing plant nitrogen isotope composition. *Trends in Plant Science*, *6*, 121–126.

F

- Fabani, M. P.; Arrúa, R. C.; Vázquez, F.; Diaz, M. P.; Baroni, M. V.; & Wunderlin, D. A. (2010). Evaluation of elemental profile coupled to chemometrics to assess the geographical origin of Argentinean wines. *Food Chemistry*, *119*, 372–379.
- FAO. (2014). *Estadísticas de producción agropecuaria y comercio. Trigo y derivados*. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Roma, Italia.
- Fardet, A. (2010). New hypotheses for the health-protective mechanisms of whole-grain cereals: what is beyond fibre? *Nutrition Research Reviews*, *23*, 65–134.
- Fares, C.; Codianni, P.; Nigro, F.; Platani, C.; Scazzina, F.; & Pellegrini, N. (2008). Processing and cooking effects on chemical nutritional and functional properties of pasta obtained from selected emmer genotypes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *88*, 2435–2444.
- Fares, C.; Platani, C.; Baiano, A.; & Menga, V. (2010). Effect of processing and cooking on phenolic acid profile and antioxidant capacity of durum wheat pasta enriched with debranning fractions of wheat. *Food Chemistry*, *119*, 1023–1029.
- Farquhar, G. D.; Ehleringer, J. R.; & Hubick, K. T. (2003). Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *40*, 503–537.
- Faure, G. (1986). *Principles of Isotope Geology* (Segunda edición). Editorial Wiley. New York, Estados Unidos.
- Faure, G., & Mensing, T. (2005). *Isotopes. Principles and Applications* (Tercera edición). Editorial John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, Estados Unidos.
- Faures, G. (2001). *Origin of Igneous Rocks: The Isotopic Evidence* (Primera edición). Editorial Springer-Verlag. Berlin, Alemania.
- Fernandez-Orozco, R.; Li, L.; Harflett, C.; Shewry, P. R.; & Ward, J. L. (2010). Effects of Environment and Genotype on Phenolic Acids in Wheat in the HEALTHGRAIN Diversity Screen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 9341–9352.
- Fraser, R. A.; Bogaard, A.; Heaton, T.; Charles, M.; Jones, G.; Christensen, B. T.; Halstead, P.; Merbach, I.; Poulton, P. R.; Sparkes, D.; & Styring, A. K. (2011). Manuring and stable nitrogen isotope ratios in cereals and pulses: towards a new archaeobotanical approach to the inference of land use and dietary practices. *Journal of Archaeological Science*, *38*, 2790–2804.

G

- García Ferreira, C. (2011). *Valoración de las propiedades antioxidantes de vinos regionales*. Tesis de Maestría. Universidad Católica de Córdoba.
- García-Conesa, M. T.; Wilson, P. D.; Plumb, G. W.; Ralph, J.; & Williams, G. (1999). Antioxidant properties of 4,4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxy-B,B'-bicycinnamic acid (8-8'-diferulic acid, non-cyclic form). *Journal of Science of Food and Agriculture*, 79, 379–384.
- García-Ruiz, S.; Moldovan, M.; Fortunato, G.; Wunderli, S.; & García Alonso, J. I. (2007). Evaluation of strontium isotope abundance ratios in combination with multi-elemental analysis as a possible tool to study the geographical origin of ciders. *Analytica Chimica Acta*, 590, 55–66.
- Gawlik-Dziki, U.; Dziki, D.; Baraniak, B.; & Lin, R. (2009). The effect of simulated digestion in vitro on bioactivity of wheat bread with Tartary buckwheat flavones addition. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 137–143.
- Giles, G. I.; Tasker, K. M.; & Jacob, C. (2001). Hypothesis: the role of reactive sulfur species in oxidative stress. *Free radical biology & medicine*, 31, 1279–1283.
- Goitom Asfaha, D.; Quetel, C. R.; Thomas, F.; Horacek, M.; Wimmer, B.; Heiss, G.; Dekant, Ch.; Deters-Itzelsberger, P.; Hoelzl, S.; Rummel, S.; Brach-Papa, Ch.; Van Bockstaele, M.; Jamin, E.; Baxter, M.; Heinrich, K.; Kelly, S.; Bertoldi, D.; Bontempo, L.; Camin, F.; Larcher, R.; Perini, M.; Rossmann, A.; Schellenberg, A.; Schlicht, C.; Froeschl, H.; & Hoogewerff, Jurian Ueckermann, H. (2011). Combining isotopic signatures of $n(^{87}\text{Sr})/n(^{86}\text{Sr})$ and light stable elements (C, N, O, S) with multi-elemental profiling for the authentication of provenance of European cereal samples. *Journal of Cereal Science*, 53, 170–177.
- Guo, W.; & Beta, T. (2013). Phenolic acid composition and antioxidant potential of insoluble and soluble dietary fibre extracts derived from select whole-grain cereals. *Food Research International*, 51, 518–525.

H

- Hale, R.; Marshall, S.; Jeppe, K.; & Pettigrove, V. (2014). Separating the effects of water physicochemistry and sediment contamination on *Chironomus tepperi* (Skuse) survival, growth and development: A boosted regression tree approach. *Aquatic Toxicology*, 152, 66–73.
- Halliwell, B.; & Gutteridge, J. M. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free radical biology & medicine*, 18, 125–126.
- Heimler, D.; Vignolini, P.; Isolani, L.; Arfaioli, P.; Ghiselli, L.; & Romani, A. (2010). Polyphenol content of modern and old varieties of *Triticum aestivum* L. and *T. durum* Desf. grains in two years of production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 7329–34.
- Hemery, Y. M.; Anson, M. N.; Havenaar, R.; Haenen, G. R. M. M.; Noort, M. W. J.; & Rouau, X. (2010). Dry-fractionation of wheat bran increases the bioaccessibility of phenolic acids in breads made from processed bran fractions. *Food Research International*, 43, 1429–1438.

- Hernández, L.; Afonso, D.; Rodríguez, E. M.; & Díaz, C. (2011). Phenolic compounds in wheat grain cultivars. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66, 408–415.
- Herrero, E.; Ros, J.; Bellí, G.; & Cabisco, E. (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780, 1217–1235.
- Hiller, B.; Schlörmann, W.; Gleis, M.; & Lindhauer, M. G. (2011). Comparative study of colorectal health related compounds in different types of bread: Analysis of bread samples pre and post digestion in a batch fermentation model of the human intestine. *Food Chemistry*, 125, 1202–1212.
- Hirawan, R.; Ser, W. Y.; Arntfield, S. D.; & Beta, T. (2010). Antioxidant properties of commercial, regular- and whole-wheat spaghetti. *Food Chemistry*, 119, 258–264.
- Holtejolen, A. K.; Kinitz, C.; & Knutsen, S. H. (2006). Flavanol and Bound Phenolic Acid Contents in Different Barley Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2253–2260.
- Hu, J.-L.; Nie, S.-P.; Min, F.-F.; & Xie, M.-Y. (2013). Artificial simulated saliva, gastric and intestinal digestion of polysaccharide from the seeds of *Plantago asiatica* L. *Carbohydrate Polymers*, 92, 1143–50.
- Hung, P. V.; Maeda, T.; Miyatake, K.; & Morita, N. (2009). Total phenolic compounds and antioxidant capacity of wheat graded flours by polishing method. *Food Research International*, 42, 185–190.

J

- Jonasson, S.; Medrano, H.; & Flexas, J. (1997). Variation in leaf longevity of *Pistacia lentiscus* and its relationship to sex and drought stress inferred from leaf $\delta^{13}\text{C}$. *Functional Ecology*, 11, 282–289.
- Jonnalagadda, S. S.; Harnack, L.; Liu, R. H.; McKeown, N., Liu, S., & Fahey, G. C. (2011). Putting the whole grain puzzle together: health benefits associated with whole grains – summary of. *American Society for Nutrition 2010 Satellite Symposium. Journal of Nutrition*, 141, 1011S–1022S.

K

- Kabata-Pendias, A. (2001). *Trace Elements in Soils and Plants* (Tercera edición). Editorial CRC Press. Boca Raton, FL.
- Kawasaki, A.; Oda, H.; & Hirata, T. (2002). Determination of strontium isotope ratio of brown rice for estimating its provenance. *Soil Science and Plant Nutrition*, 48, 635–640.
- Kelly, S.; & Heaton, K. (2005). Tracing the geographical origin of food: The application of multi-element and analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 555–567.
- Kern, S. M.; Bennett, R. N.; Mellon, F. A.; Kroon, P. A.; García-Conesa, M. T. (2003). Absorption of hydroxycinnamates in humans after high-bran cereal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6050–6055.

- Kim, K.; Tsao, R.; Yang, R.; & Cui, S. (2006). Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry*, 95, 466–473.
- Kim, K. W.; & Thornton, Y. (1993). Influence of Ordovician uraniferous black shales on the trace element composition of soils and food crops, Korea. *Applied Geochemistry*, 2, 249S–255S.
- Kment, P.; Mihaljevic, M.; Ettler, V.; Sebek, O.; Strnad, L.; & Rohlová, L. (2005). Differentiation of Czech wines using multielement composition – A comparison with vineyard soil. *Food Chemistry*, 91, 157–165.
- Knuckles, B. E.; Hudson, C. A.; Chiu, M. M.; & Sayre, R. N. (1997). Effect of β -glucan barley fractions in high-fiber bread and pasta. *Cereal Foods World*, 42, 94–99.

L

- Land, M.; Ingri, J.; Andersson, P. S.; & Öhlander, B. (2000). Ba/Sr, Ca/Sr and $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ratios in soil water and groundwater: implications for relative contributions to stream water discharge. *Applied Geochemistry*, 15, 311–325.
- Lang, R.; & Jebb, S. A. (2003). Who consumes whole grains, and how much? *Proceedings of the Nutrition Society*, 62, 123–127.
- Larsen, T.; Gorissen, A.; Henning Krogh, P.; Ventura, M.; & Magid, J. (2007). Assimilation dynamics of soil carbon and nitrogen by wheat roots and Collembola. *Plant Soil*, 295, 253–264.
- Larsson, S. C.; Giovannucci, E.; Bergkvist, L.; & Wolk, A. (2005). Whole grain consumption and risk of colorectal cancer: a population-based cohort of 60,000 women. *British Journal of Cancer*, 92, 1803–1807.
- Laursen, K. H.; Schjoerring, J. K.; Olesen, J. E.; Askegaard, M.; Halekoh, U.; & Husted, S. (2011). Multielemental Fingerprinting as a Tool for Authentication of Organic Wheat, Barley, Faba Bean, and Potato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 4385–4396.
- Leathwick, J. R.; Elith, J.; Chadderton, W. L.; Rowe, D.; & Hastie, T. (2008). Dispersal, disturbance and the contrasting biogeographies of New Zealand's diadromous and non-diadromous fish species. *Journal of Biogeography*, 35, 1481–1497.
- Lee, J. M.; Calkins, M. J.; Chan, K. M.; Kan, Y. W.; & Johnson, J. A. (2003). Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 12029–12038.
- Lemanska, K.; Szymusiak, H.; Tyrakowska, B.; Zielinski, R.; Soffer, A. E. M. F.; & Rietjens, I. M. C. M. (2001). The influence of pH on the antioxidant properties and the mechanisms of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biology & Medicine*, 31, 869–881.
- Lempereur, I.; Surget, A.; & Rouau, X. (1998). Variability in dehydrodiferulic acid composition of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) and distribution in milling fractions. *Journal of Cereal Science*, 28, 251–258.

- Li, W.; Shan, F.; Sun, S.; Corke, H.; & Beta, T. (2005). Free radical scavenging properties and phenolic content of Chinese black-grained wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8533–8536.
- Liu, Q.; Qiu, Y.; & Beta, T. (2010). Comparison of antioxidant activities of different colored wheat grains and analysis of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9235–9241.
- Liu, R. H. (2002). Supplement quick fix fails to deliver. *Food Technology International*, 1, 71–72.
- Liu, R. H. (2007). Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, 46, 207–219.
- Liu, R. H.; & Finley, J. (2005). Potential cell culture models for antioxidant research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4311–4314.
- Liyana-Pathirana, C. M.; & Shahidi, F. (2006). Importance of Insoluble-Bound Phenolics to Antioxidant Properties of Wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1256–1264.
- Liyana-Pathirana, C.M.; & Shahidi, F. (2005). Antioxidant activity of commercial soft and hard wheat (*Triticum aestivum* L.) as affected by gastric pH conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2433–2440.
- Lobo, V.; Phatak, A.; & Chandra, N. (2010). Free radicals and functional foods: impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4, 118–126.
- Lopez-Martinez, L. X.; Oliart-Ros, R. M.; Valerio-Alfaro, G.; Lee, C.-H.; Parkin, K. L.; & Garcia, H. S. (2009). Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1187–1192.
- Lü, J.; Lin, P. H.; Yao, Q.; & Chen, C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14, 840–860.
- Lv, J.; Lu, Y.; Niu, Y.; Whent, M.; Fawzy, M.; Costa, J.; & Yu, L. (Lucy). (2013). Effect of genotype, environment, and their interaction on phytochemical compositions and antioxidant properties of soft winter wheat flour. *Food Chemistry*, 138, 454–462.

M

- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727–47.
- Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 230–242.
- Massart, D. L. (1998). *Chemometrics and Qualimetrics*. Editorial Elsevier. Amsterdam, Países Bajos.

- Mateo Anson, N.; Havenaar, R.; Bast, A.; & Haenen, G. R. M. M. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory capacity of bioaccessible compounds from wheat fractions after gastrointestinal digestion. *Journal of Cereal Science*, 51, 110–114.
- Mateo Anson, N.; van den Berg, R.; Havenaar, R.; Bast, A.; & Haenen, G. R. M. M. (2008). Ferulic acid from aleurone determines the antioxidant potency of wheat grain (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5589–5594.
- Mateo Anson, N.; van den Berg, R.; Havenaar, R.; Bast, A.; & Haenen, G. R. M. M. (2009). Bioavailability of ferulic acid is determined by its bioaccessibility. *Journal of Cereal Science*, 49, 296–300.
- Monferrán, M. V. (2006). *Impacto de clorobencenos sobre la calidad del agua e ectiofauna de la cuenca del río Suqupia. Evaluación de ecotoxicidad y biodegradabilidad*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Córdoba.
- Moore, J.; Hao, Z.; Zhou, K.; Luther, M.; Costa, J.; & Yu, L. L. (2005). Carotenoid, tocopherol, phenolic acid, and antioxidant properties of Maryland-grown soft wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6649–6657.
- Moore, J.; Liu, J.-G.; Zhou, K.; & Yu, L. (Lucy). (2006). Effects of Genotype and Environment on the Antioxidant Properties of Hard Winter Wheat Bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5313–5322.
- Morrás, H. J. M. (1999). Geochemical differentiation of Quaternary sediments from the Pampean region based on soil phosphorus contents as detected in the early 20th century. *Quaternary International*, 62, 57–67.
- Mortorell, P.; Forment, J. V.; De-Llanos, R.; Montón, F.; Llopis, S.; & González, N. (2011). Use of *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans* as model organisms to study the effect of cocoa polyphenols in the resistance to oxidative stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2077–2085.

N

- Na, H. K.; & Surh, Y. J. (2006). Intracellular signaling network as a prime chemopreventive target of (-)-epigallocatechin gallate. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50, 152–159.
- Nagah, A. M.; & Seal, C. J. (2005). In vitro procedure to predict apparent antioxidant release from wholegrain foods measured using three different analytical methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1177–1185.
- Narwal, S.; Thakur, V.; Sheoran, S.; Dahiya, S.; Jaswal, S.; & Gupta, R. K. (2012). Antioxidant activity and phenolic content of the Indian wheat varieties. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 23, 11–17.
- Neilson, A. P.; & Ferruzzi, M. G. (2011). Influence of formulation and processing on absorption and metabolism of flavan-3-ols from tea and cocoa. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2, 125–151.
- Nyholm, N. E. I.; & Tyler, G. (2000). Rubidium content of plants, fungi and animals closely reflects potassium and acidity conditions of forest soils. *Forest Ecology and Management*, 134, 89–96.

O

- O'Leary, M. H. (1981). Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry*, 40, 553–567.
- O'Leary, M. H. (1995). Environmental effects on carbon isotope fractionation in terrestrial plants. En *Stable isotope in the biosphere*. Editores: E. Wada, T. Yoneyama, M. Mingawa, & T. Ando. Editorial Kyoto Univeristy Press. Kyoto, Japan.
- Okarter, N.; Liu, C.-S.; Sorrells, M. E.; & Liu, R. H. (2010). Phytochemical content and antioxidant activity of six diverse varieties of whole wheat. *Food Chemistry*, 119, 249–257.

P

- Peltora, P.; Brun, C.; Aström, M.; & Tomilina, O. (2008). High K/Rb ratios in stream waters- Exploring plant litter decay, ground water and lithology as potential controlling mechanisms. *Chemical Geology*, 257, 92–100.
- Pérez-Jiménez, J.; & Saura-Calixto, F. (2005). Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5036–5040.
- Pérez-Jiménez, J.; & Torres, J. L. (2011). Analysis of nonextractable phenolic compounds in foods: the current state of the art. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 12713–12724.
- Pett-Ridge, J. C.; Derry, L. A.; & Barrows, J. K. (2009). Ca/Sr and ⁸⁷Sr/⁸⁶Sr ratios as tracers of Ca and Sr cycling in the Rio Icacos watershed, Luquillo Mountains, Puerto Rico. *Chemical Geology*, 267, 32–45.
- Piasentier, E.; Valusso, R.; Camin, F.; & Versini, G. (2003). Stable isotope ratio analysis for authentication of lamb meat. *Meat Science*, 64, 239–247.
- Pietta, P. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 1035–1042.
- Pilgrim, T. S.; Watling, R. J.; & Grice, K. (2010). Application of trace element and stable isotope signatures to determine the provenance of tea (*Camellia sinensis*) samples. *Food Chemistry*, 118, 921–926.
- Prior, R. L.; Wu, X.; & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290–302.
- Procházková, D.; Boušová, I.; & Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82, 513–523.
- Pulido, R.; Bravo, L.; & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3396–3402.

Q

Qiu, Y.; Liu, Q.; & Beta, T. (2010). Antioxidant properties of commercial wild rice and analysis of soluble and insoluble phenolic acids. *Food Chemistry*, 121, 140–147.

R

Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2, 219–236.

Ramírez-Moreno, E.; Marqués, C. D.; Sánchez-Mata, M. C.; & Goñi, I. (2011). In vitro calcium bioaccessibility in raw and cooked cladodes of prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* L. Miller). *LWT - Food Science and Technology*, 44, 1611–1615.

Ramis Ramos, G.; & García Álvarez-Coque, M. C. (2001). *Quimiometría* (Primera edición). Editores: G. Ramis Ramos & M. C. García Álvarez-Coque. Editorial Síntesis, S.A. Madrid, España.

Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231–1237.

Rebolo, S.; Peña, R. M.; Latorre, M. J.; García, S.; Botana, A. M.; & Herrero, C. (2000). Characterisation of Galician (NW Spain) Ribeira Sacra wines using pattern recognition analysis. *Analytica Chimica Acta*, 417, 211–220.

Rice-Evans, C. (2001). Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*, 8, 797–807.

Rice-Evans, C. A.; & Miller, N. J. (1994). Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in Enzymology*, 234, 279–293.

Rice-Evans, C.; Miller, N. J.; & Paganda, G. (1996). Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 933–956.

Ridgeway, G. (2013). gbm: Generalized Boosted Regression Models.

Rossmann, A.; Haberhauer, G.; Hölzl, S.; Horn, P.; Pichlmayer, F.; & Voerkelius, S. (2000). The potential of multielement stable isotope analysis for regional origin assignment of butter. *European Food Research and Technology*, 211, 32–40.

S

Sang, S.; Ju, J.; Lambert, J. D.; Lin, Y.; Hong, J.; Bose, M.; Wang, S.; Bai, N.; He, K.; Reddy, B. S.; Ho, Chi-T.; Li, F.; & Yang, C. S.. (2006). Wheat Bran Oil and Its Fractions Inhibit Human Colon Cancer Cell Growth and Intestinal Tumorigenesis in *Apc^{min/+}* Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9792–9797.

Saura-Calixto, F.; Serrano, J.; & Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101, 492–501.

- Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; & Rémésy, C. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 287–306.
- Scalbert, A.; & Williamson, G. (2000). Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130, 2073S–2085S.
- Schatzkin, A.; Park, Y.; Leitzmann, M. F.; Hollenbeck, A. R.; & Cross, A. J. (2008). Prospective Study of Dietary Fiber, Whole Grain Foods, and Small Intestinal Cancer. *Gastroenterology*, 135, 1163–1167.
- Senbayram, M.; Dixon, L.; Goulding, K. W. T.; & Bol, R. (2008). Long-term influence of manure and mineral nitrogen applications on plant and soil ¹⁵N and ¹³C values from the Broadbalk Wheat Experiment. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22, 1735–1740.
- Serpen, A.; Gökmen, V.; Karagöz, A.; & Köksel, H. (2008). Phytochemical Quantification and Total Antioxidant Capacities of Emmer (*Triticum dicoccon* Schrank) and Einkorn (*Triticum monococcum* L.) Wheat Landraces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7285–7292.
- Siebenhandl, S.; Grausgruber, H.; Pellegrini, N.; Del Rio, D.; Fogliano, V.; Pernice, R.; & Berghofer, E. (2007). Phytochemical profile of main antioxidants in different fractions of purple and blue wheat, and black barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8541–8547.
- SIIA. (2014). *Estadísticas, Agricultura. Trigo*. Sistema Integrado de Información Agropecuaria. Obtenido de <http://www.siia.gov.ar/series>.
- Singh, P. P.; Chandra, A.; Mahdi, F.; Ray, A.; & Sharma, P. (2010). Reconvene and reconnect the antioxidant hypothesis in Human health and disease. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 25, 225–243.
- Singleton, V. L.; & Rossi, J. A. J. (1965). Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Slater, T. F. (1984). Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochemical Journal*, 222, 1–15.
- Smith, J.; Vance, D.; Kemp, R. A.; Archer, C.; Toms, P.; King, M.; & Zárate, M. (2003). Isotopic constraints on the source of Argentinian loess - with implications for atmospheric circulation and the provenance of Antarctic dust during recent glacial maxima. *Earth and Planetary Science Letters*, 212, 181–196.
- Srinivasan, V. S. (2001). Bioavailability of nutrients: a practical approach to in vitro demonstration of the availability of nutrients in multivitamin-mineral combination products. *Journal of Nutrition*, 131, 1349S–1350S.
- Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30, 3268–3295.
- Steiger, R. H.; & Jäger, E. (1977). Subcommittee on Geochronology: convention on the use of decay constants in geo- and cosmochronology. *Earth and Planetary Science Letters*, 36, 359–362.

- Stewart, B. W.; Capo, R. C.; & Chadwick, O. A. (1998). Quantitative strontium isotope models for weathering, pedogenesis and biogeochemical cycling. *Geoderma*, 82, 173-195.
- Stracke, B. A.; Eitel, J.; Watzl, B.; Mäder, P.; & Rüfer, C. E. (2009). Influence of the production method on phytochemical concentrations in whole wheat (*Triticum aestivum* L.): a comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10116–10121.
- Sun, M. Y.; Dafforn, K. A.; Brown, M. V.; & Johnston, E. L. (2012). Bacterial communities are sensitive indicators of contaminant stress. *Marine Pollution Bulletin*, 64, 1029–1038.
- Suzuki, Y.; Chikaraishi, Y.; Ogawa, N. O.; Ohkoichi, N.; & Korenaga, T. (2008). Geographical origin of polished rice based on multiple element and stable isotope analyses. *Food Science*, 109, 470–475.

V

- Verardo, V.; Arraez-Roman, D.; Segura-Carretero, A.; Marconi, E.; Fernandez-Gutierrez, A.; & Caboni, M. F. (2011). Determination of free and bound phenolic compounds in buckwheat spaghetti by RP-HPLC-ESI-TOF-MS: effect of thermal processing from farm to fork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 7700–7707.
- Verardo, V.; Arráez-Román, D.; Segura-Carretero, A.; Marconi, E.; Fernández-Gutiérrez, A.; & Caboni, M. F. (2010). Identification of buckwheat phenolic compounds by reverse phase high performance liquid chromatography–electrospray ionization–time of flight–mass spectrometry (RP-HPLC–ESI-TOF-MS). *Journal of Cereal Science*, 52, 170–176.
- Verma, B.; Hucl, P.; & Chibbar, R. N. (2009). Phenolic acid composition and antioxidant capacity of acid and alkali hydrolysed wheat bran fractions. *Food Chemistry*, 116, 947–954.
- Vitaglione, P.; Napolitano, A.; & Fogliano, V. (2008). Cereal dietary fibre: a natural functional ingredient to deliver phenolic compounds into the gut. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 451–463.
- Voerkelius, S.; Lorenz, G. D.; Rummel, S.; Quérel, C. R.; Heiss, G.; Baxter, M.; Brach-Papa, C.; Deters-Itzelsberger, P.; Hoelzl, S.; Hoogewerff, J.; Ponzevera, E.; Van Bockstaele, M.; & Ueckermann, H. (2010). Strontium isotopic signatures of natural mineral waters, the reference to a simple geological map and its potential for authentication of food. *Food Chemistry*, 118, 933–940.

W

- Wunderlin, D. A. (2005). Evaluation of fingerprints in foods, a way to chemical traceability. En 1° Workshop ALCUEFOOD (Unión Europea – Latin American Countries). Chile.

Y

- Yokoo, Y.; & Nakano, T. (1996). Leaching experiment of volcanic soil for the determination of plant-available cations using Sr isotopes. *Annual Report of Institute of Geoscience, the University of Tsukuba*, 22, 37–40.
- Yu, L.; Perret, J.; Harris, M.; Wilson, J.; & Haley, S. (2003). Antioxidant properties of bran extracts from “Akron” wheat grown at different locations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1566–1570.

Z

- Zárate, M. A. (2003). Loess of southern South America. *Quaternary Science Reviews*, 22, 1987–2006.
- Zhang, Y.; Wang, L.; Yao, Y.; Yan, J.; & He, Z. (2012). Phenolic acid profiles of Chinese wheat cultivars. *Journal of Cereal Science*, 56, 629–635.
- Zhao, H.; Guo, B.; Wei, Y.; Zhang, B.; Sun, S.; Zhang, L.; & Yan, J. (2011). Determining the Geographic Origin of Wheat Using Multielement Analysis and Multivariate Statistics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 4397–4402.
- Zhao, X. L. (2006). Effects of nitrogen and phosphorus fertilization and sowing date on dynamic changes of grain sedimentation value during grain filling stage of spring wheat. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 17, 640–646.
- Zhao, Z.; & Moghadasian, M. H. (2009). Bioavailability of hydroxycinnamates: a brief review of in vivo and in vitro studies. *Phytochemistry Reviews*, 9, 133–145.
- Zhou, K.; Laux, J. J.; & Yu, L. (2004). Comparison of Swiss red wheat grain and fractions for their antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1118–1123.
- Zhou, K.; & Yo, L. (Lucy). (2004). Antioxidant Properties of Bran Extracts from Trego Wheat Grown at Different Locations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1112–1117.
- Zhou, K.; & Yu, L. (2004). Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. *LWT - Food Science and Technology*, 37, 717–721.
- Zielinski, H.; Kozłowska, H.; & Lewczuk, B. (2001). Bioactive compounds in the cereal grains before and after hydrothermal processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2, 159–169.

The background features a soft-focus image of a wheat field under a bright sky. A vertical green bar on the right side contains a close-up of a wheat ear. The text 'PUBLICACIONES LOGRADAS' is centered in a bold, green, sans-serif font.

PUBLICACIONES LOGRADAS

PUBLICACIONES LOGRADAS DURANTE LA TESIS

Durante la realización de esta tesis doctoral se presentaron 15 trabajos en distintos congresos nacionales e internacionales, y se publicaron los siguientes trabajos científicos en revistas internacionales:

1. “*Main Flavonoids, DPPH Activity and Metal Content Allow Determining the Geographical Origin of Propolis from the Province of San Juan (Argentina)*”. Lima B., Tapia A., Luna L., Fabani M.P., Schmeda-Hirschmann G., Podio N.S., Wunderlin D.A. and Feresin G.E., *J. Agric. Food Chem.* 57: 2691–2698 (2009).
2. “*Fingerprints for Main Varieties of Argentinean Wines: Terroir Differentiation by Inorganic, Organic, and Stable Isotopic Analyses Coupled to Chemometrics*”. Di Paola-Naranjo, R.D., Baroni, M.V., Podio N.S., Rubinstein, H.R., Fabani M.P., Badini, R.G., Inga, M., Oстера, H.A., Cagnoni, M., Gallegos, E., Gautier, E, Peral-García, P., Hoogewerff, J., and Wunderlin D.A., *J. Agric. Food Chem.* 59: 7854 -7865 (2011).
3. “*How much do Soil and Water Contribute to the Composition of Meat? A Case Study: Meat from Three Areas of Argentina*”. Baroni, M.V., Podio N.S., Badini, R.G., Inga C.M., Oстера, H.A., Cagnoni, M., Gallegos, E., Gautier, E, Peral-García, P., Hoogewerff, J., and Wunderlin D.A., *J. Agric. Food Chem.* 59: 11117 – 11128 (2011).
4. “*Elemental and Isotopic Fingerprint of Argentinean Wheat. Matching Soil, Water and Crop Composition to Differentiate Provenance*”. Podio N.S., Baroni, M.V., Badini, R.G., Inga C.M., Oстера, H.A., Cagnoni, M., Gautier, E.A., Peral-García, P., Hoogewerff, J., and Wunderlin D.A., *J. Agric. Food Chem.* 61: 3763–3773 (2013).
5. “*Linking soil, water and honey composition to assess the geographical origin of Argentinean honey by multielemental and isotopic analyses*”. Baroni, M.V., Podio N.S., Badini, R.G., Inga C. M., Oстера, H.A., Cagnoni, M., Gautier, E.A., Peral-García, P., Hoogewerff, J., and Wunderlin D.A., *J. Agric. Food Chem.* Aceptado con revisiones menores (2015).